

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

4
258

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**MODELO ANIMAL PARA LA TERAPIA GENICA
DEL CANCER CERVICO-UTERINO**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
PRESENTA

RONIT OVSEIOVICH ZONSZEIN

MEXICO, MCMXCIII

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	2
¿QUE SON LOS PAPILOMAVIRUS Y CUAL ES SU RELACION CON EL CANCER?	2
PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 18 Y SU PROTEINA E2	5
¿QUE ES UN RATON ATIMICO?	11
LA TERAPIA GENICA EN LA ACTUALIDAD	13
¿CUAL ES LA PREGUNTA QUE MUEVE A ESTA TESIS?	17
METODOLOGIA	19
DISEÑO GENERAL DE LOS EXPERIMENTOS	19
MAXIPREPARACION Y PURIFICACION DE PLASMIDOS.	19
CUIDADO DE RATONES ATIMICOS.	21
CULTIVO Y PREPARACION DE CELULAS HeLa	22
Cultivo de las células	
Preparación de las células para su inyección	
Inyección subcutanea de células en ratones atímicos	
MEDICION DE TUMORES	23
INYECCION DE DNA EN LOS TUMORES	25
Método de Inyección Directa	
Método de Inyección con Liposomas	
Método de Inyección con Fosfato de Calcio	
METODOS DE TRANSFECCION DE CELULAS	26
Directo	
Con Liposomas	
Con cristales de DNA/ Fosfato de Calcio	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ENSAYO PARA DETECTAR B-GALACTOSIDASA EN CORTES DE TUMOR	27
ENSAYO CAT EN EXTRACTOS DE TUMORES Y EN CELULAS EN CULTIVO	29
-Preparación de extractos para realizar el ensayo CAT a partir de tumores crecidos en ratones atímicos.	
-Preparación de extractos para realizar el ensayo CAT a partir de cultivos celulares.	
-Ensayo Bradford para cuantificar proteína total de los extractos.	
-Ensayo CAT.	
RESULTADOS Y DESARROLLO DEL PROYECTO	32
PRODUCCION DE TUMORES HUMANOS DE ORIGEN CERVICAL EN RATONES ATIMICOS	32
INYECCION DIRECTA DE DNA EN LOS TUMORES	33
TIEMPO OPTIMO DE EXPRESION DEL GEN INYECTADO	36
COMPARACION DE LA EFICIENCIA DE LA EXPRESION, A PARTIR DE DIFERENTES FORMAS DE INTRODUCCION DE DNA	38
INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE TUMORES HUMANOS DE ORIGEN CERVICAL DEBIDO A LA INYECCION DIRECTA DE PLASMIDOS QUE PRODUCEN LA PROTEINA E2	41
LA INHIBICION DE CRECIMIENTO TUMORAL ES PROPORCIONAL A LA CANTIDAD DE DNA INYECTADO	42
CON UNA CONSTRUCCION MEJORADA PARA PRODUCIR E2, SE OBTIENEN RESULTADOS MAS EFICIENTES	45
COCONCLUSIONES Y DISCUSION	49
CONCLUSIONES GENERALES	53
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	55
BIBLIOGRAFIA	58

RESUMEN

El papilomavirus humano tipo 18 (HPV18), relacionado con el cáncer cérvico-uterino, se encuentra integrado en las células HeLa, provenientes de un adenocarcinoma humano. Estas células producen tumores al ser inoculadas en ratones atímicos.

El genoma del virus del papiloma es una molécula de DNA de doble cadena que codifica para casi una decena de proteínas, necesarias para que el virus sobreviva dentro de la célula. Entre éstas, las proteínas E6 y E7 son oncogénicas y capaces de inmortalizar algunas líneas celulares. La expresión de estos oncogenes se regula por la región de control del virus (LCR), que contiene varios sitios de unión a factores tanto virales como celulares.

La proteína viral E2 es un factor que se une al LCR y reprime la transcripción de los oncogenes. Muchos estudios sugieren que la presencia de E2 es incompatible con la continua producción de E6 y E7 y que se encuentra ausente en todos los tumores cérvico-uterinos que contienen HPV18.

Durante el desarrollo de este trabajo la pregunta fundamental fue: si estando presente la proteína E2 en tumores de este tipo (con HPV18), se inhibe la producción de los oncogenes y consecuentemente los tumores dejan de crecer.

Para contestar ésto, inyectamos a ratones atímicos DNA que codifica para E2 directamente en los tumores producidos por células HeLa. Observamos, en todos los casos, inhibición del crecimiento tumoral.

Así mismo, realizamos una serie de ensayos enfocados a demostrar que el DNA se expresa cuando se inyecta directamente en tumores.

ANTECEDENTES

¿QUE SON LOS PAPILOMAVIRUS Y CUAL ES SU RELACION CON EL CANCER?

Los virus pueden contribuir al desarrollo de tumores humanos utilizando diferentes mecanismos: indirectamente, al inducir inmunosupresión, o modificar el genoma de la célula huésped sin la necesidad de persistir; directamente al producir oncoproteínas o alterar la expresión de las proteínas del huésped en el sitio de integración del DNA viral (ver zur Hausen, 1991).

Los cánceres humanos asociados con papilomavirus, junto con el virus de la hepatitis B, el virus de Epstein-Barr y las leucemias y linfomas de células T causadas por infecciones virales: son responsables de aproximadamente el 15 por ciento de los casos de cáncer en todo el mundo. El cáncer de cervix y el carcinoma hepatocelular suman el 80 por ciento de los cánceres ligados a virus. Debido a que los datos experimentales y epidemiológicos implican a los virus como causantes, especialmente de cáncer cervical y hepático, debemos pensar en los virus como el segundo factor de riesgo para el desarrollo de cáncer humano, rebasado únicamente por el consumo de tabaco (ver zur Hausen, 1991).

La historia de la relación entre los virus y el cáncer comienza en Copenhague en 1902, cuando Ellerman y Bang logran transmitir leucemia de un pollo leucémico a otro mediante ultrafiltrados de sangre. Todo esto fué recibido con muchas reservas, ya que "el cáncer no es contagioso" y parecía imposible que un virus estuviera implicado en su desarrollo. La misma suerte corrió el descubrimiento de Peyton Rous, seis años después, quien demostró que ciertos tumores de pollo, denominados sarcomas, también podían ser transmitidos por 'virus filtrantes'.

En 1907, Ciuffo demostró que las verrugas humanas son de naturaleza viral. Comenzando la historia de la investigación de los papilomavirus. Han pasado ya 60 años, desde que Shope estudió el primer papilomavirus en el conejo cola de algodón (CRPV).

Los papilomavirus son miembros de la familia de los Papovaviridae, su genoma consta de una cadena doble circular de DNA de aproximadamente 8,000 pares de bases y se encuentra compactado con histonas, formando nucleosomas y encapsidado en viriones icosaedricos de 72 capsómeros (ver

Giri y Danos, 1986). La familia de los papilomavirus humanos (de más de 60 miembros) induce proliferaciones epiteliales o fibroepiteliales en piel o mucosa de humanos. Estos tumores, llamados papilomas o verrugas, son generalmente benignos y tienen con frecuencia regresión espontánea. Sin embargo, algunos miembros de la familia de los papilomas inducen lesiones que pueden progresar a carcinomas epiteliales malignos, generalmente después de un largo período de latencia (ver Sousa *et al*, 1990). Los papilomavirus humanos (HPVs) tipo 16, 18, 31, 33 y 35 se han encontrado relacionados con cáncer genital. Por otro lado un segundo grupo de HPV's que infectan el tracto genital, los tipos 6, 11 y 10, rara vez se han encontrado en tumores malignos (ver Giri y Danos, 1986).

Hace más de 10 años Harald zur Hausen sugirió el posible papel de los papilomavirus en la inducción del cáncer cervical. Un problema técnico

para el estudio de éste virus es que no puede ser propagado en cultivos celulares. Los primeros experimentos realizados con material fresco aislado de verrugas, fracasaban frecuentemente por la escasa cantidad de virus obtenido (ver Pfister *et al*, 1987).

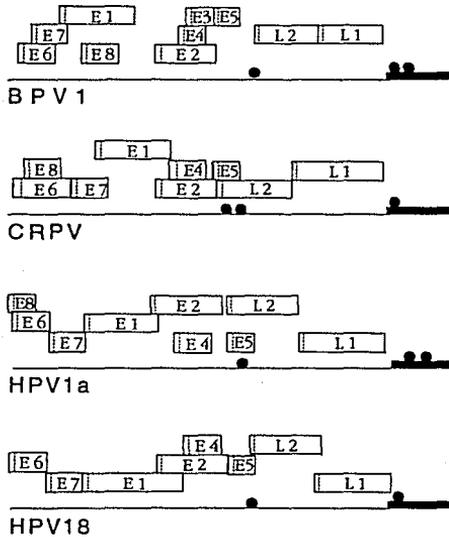


FIGURA 1. ORGANIZACION DEL GENOMA DE ALGUNOS PAPILOMAVIRUS. Se observa un esquema de los genes tempranos (E) y tardíos (L). Papilomavirus Bovino tipo 1 (BPV1), Papilomavirus de conejo cola de algodón (CRPV), Papilomavirus Humano tipo 1a (HPV1a) y tipo 18 (HPV18). La línea vertical punteada representa el primer codón ATG de cada gen. Los círculos negros son sitios de poliadenilación. Las líneas oscuras indican la región de control.

GEN	FUNCION
E1	REPLICACION
E2	MODULADOR DE LA TRANSCRIPCION / REPLICACION
E4	MADURACION DEL VIRION
E5	TRANSFORMANTE
E6	TRANSFORMANTE
E7	TRANSFORMANTE
L1	PROTEINA DE CAPSIDE
L2	PROTEINA DE CAPSIDE

TABLA 1. FUNCION DE LOS GENES VIRALES.

En 1980 Gissman y zur Hausen dieron un gran paso cuando lograron aislar DNA del papilomavirus humano tipo 6 (HPV-6) de un condiloma. La aplicación posterior de nuevas metodologías de ingeniería

genética y de biología molecular, permitieron aislar e identificar muchos otros tipos de papilomavirus.

Mary y Alan Pater en 1985, descubren que los HPV-16 y HPV-18 se encuentran en líneas celulares derivadas de tumores cervicales. Analizan ocho líneas de las cuales seis contienen secuencias de HPV-16 ó HPV-18, resulta notable que el DNA de estos virus sige presente después de numerosos pasajes celulares.

Aún cuando existe poca homología entre el papilomavirus de origen animal y el de origen humano, ambos poseen muchas propiedades en común. En particular presentan una organización genómica similar que consta de por lo menos 8-9 marcos de lectura abierta, todos en la misma hebra de DNA (fig 1). El genoma del papilomavirus se puede dividir funcionalmente en dos regiones codificadoras, separadas por un segmento no codificador de 0.4 a 1.0 Kb.

La región codificadora temprana (E) contiene a los genes E1-E7, incluyendo la información necesaria para la replicación viral y la transformación celular. La región tardía (L) consta de los genes L1 y L2, los cuales se expresan solamente en queratinocitos diferenciados y codifican para proteínas estructurales de la partícula viral (ver Tabla 1). En los genomas de todos los papilomavirus existe una región reguladora de la transcripción y de la replicación, llamada la Región Larga de Control (LCR) (conocida también como la región no codificadora), la cual se encuentra localizada entre el final del gen tardío L1 y el principio del gen temprano E6 (figs 1 y 2) (ver Sousa *et al*, 1990).

PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 18 Y SU PROTEINA E2.

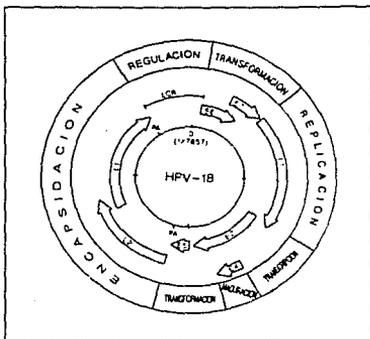


FIGURA 2. MAPA GENETICO DE UN PAPILOMAVIRUS GENITAL. Se muestra el mapa genético de HPV tipo 18. Los genes tempranos (E) y los tardíos (L) se transcriben con la misma orientación. Se indica la principal función de los diversos genes, así como la region que controla la expresión de los oncogenes E6 y E7 (LCR) y las señales de poliadenilación de los transcritos (pA).

En los carcinomas humanos, las secuencias de HPV generalmente se encuentran integradas al genoma celular, sugiriendo que la integración juega un papel importante en la progresión carcinogénica (Boshart *et al*, 1984; Durst *et al*, 1985; Matsukura *et al*, 1989; Cullen *et al*, 1991). No parece existir un sitio específico de integración del DNA viral en el genoma hospedero (Durst

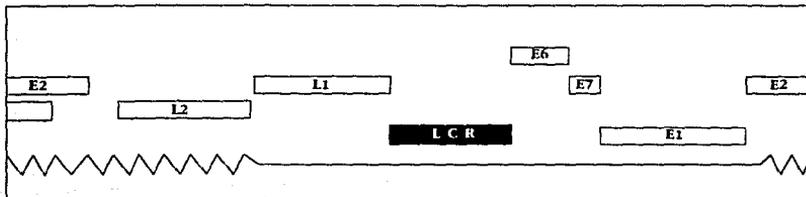


FIGURA 3. PATRON CARACTERISTICO DE INTEGRACION DEL HPV18 EN CELULAS HeLa. Se observa un esquema de los genes tempranos (E) y tardíos (L), y la región de control (LCR). La integración al genoma hospedero ocasiona la rotura del gen E2. El transcrito viral se inicia en la LCR, produciendo siempre los oncogenes E6 y E7. El DNA celular se representa con líneas en zig-zag.

et al, 1987), pero si existe un patrón de integración característico con respecto al genoma viral (fig 3) (Shwarz *et al*, 1985). La expresión de los genes **E6** y **E7** siempre se mantiene y regularmente se observa rotura o delección de los genes **E1** y **E2** (J. Berumen, 1993) (ver K. Munger *et al*, 1992).

La secuencia de HPV-18 se encuentra integrada en el genoma de líneas celulares derivadas de biopsias de cáncer cervical. Tal es el caso de las células HeLa, derivadas en 1951 de un carcinoma epitelioide de la paciente Henrietta Lacks. Estas células, además de ser inmortales, son

tumorigénicas, pues provocan la aparición de tumores al ser inoculadas en ratones atímicos. Los transcritos virales se inician en la LCR del genoma viral integrado. La información para la que codifican estos RNAs esta confinada básicamente a la de los genes E6, E7 y E1 de la región temprana (Schneider-Gadicke y Schwarz, 1986).



HENRIETTA LACKS

Estudios moleculares han demostrado que tanto E6 como E7 son oncoproteínas. E7 de HPV-16 ó HPV-18 por sí sola, es suficiente para transformar líneas celulares de fibroblastos (Kanda et al, 1988; Vousden et al, 1988). La expresión de E7 induce la formación de focos en estas líneas celulares, y lleva a una

independencia de anclaje y a tumorigenicidad en ratones desnudos. Se sabe que la proteína E7 se une a retinoblastoma (Rb), un factor regulador del ciclo celular. Esta unión provoca la inactivación de Rb, y la progresión del ciclo celular a la fase S, ocasionando un crecimiento celular incontrolado (ver Sousa et al, 1990).

La proteína E6, es necesaria para la immortalización eficiente de células humanas primarias de origen tanto epitelial como fibroblástico (Munger et al, 1989). E6 forma un complejo con la proteína p53 supresora de tumores, promoviendo su degradación (ver Munger et al, 1992).

Análisis funcionales y de interacciones DNA-proteínas de la LCR del HPV-18 han proporcionado evidencia que esta región contiene las secuencias importantes para la regulación de la transcripción de E6 y E7. Incluyendo elementos 'enhancer', sitios de unión para receptores de hormonas (glucocorticoides), sitios para factores activadores como AP-1 y secuencias

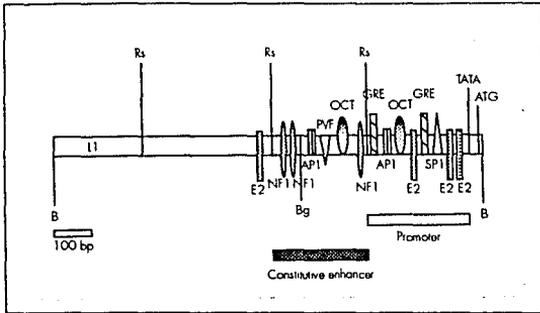


FIGURA 4. ESQUEMA DE LA REGION DE CONTROL (LCR) DEL HPV18. Se indican los sitios de interacción con factores de transcripción virales y celulares así como los sitios para las enzimas Rsa1 (Rs) y Bam H1 (B).

específicas para la unión de la proteína viral E2 (fig 4) (García-Carrancá *et al*, 1988).

Desde la observación original, en 1985, de que el gen E2 del papilomavirus bovino tipo-1 (BPV-1) codifica para un activador transcripcional (Spalholz *et al*, 1985), se ha encontrado la misma propiedad en muchos otros E2s. El producto completo del gen E2 es una proteína de 48 KDa la cual presenta una estructura conservada y predecible con tres

distintos dominios (Fig 5). Esta estructura se encuentra bien conservada en los diferentes papilomavirus, a pesar de su divergencia en secuencias primarias (ver Thiery, 1993).

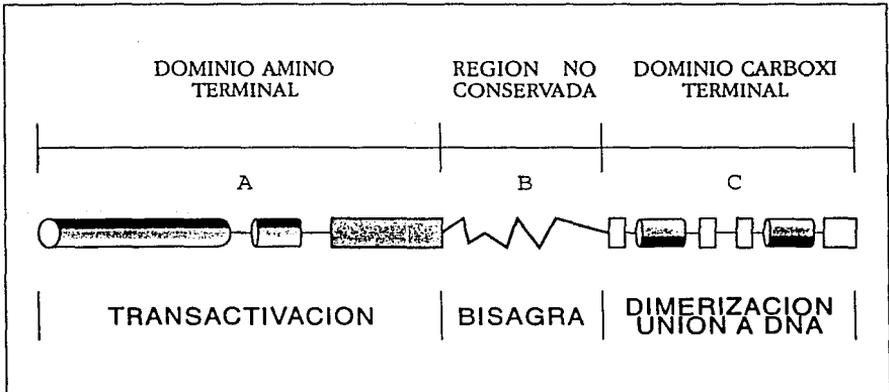


FIGURA 5. DOMINIOS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES DE LA PROTEINA E2. Arriba se indican los tres dominios definidos por la comparación de secuencias de aminoácidos de distintas proteínas E2 de varios papilomavirus. En medio, la predicción de la estructura secundaria, las alfa hélices potenciales se representan con cilindros, las cajas representan regiones de β -plegados y la region de 'Bisagra' se muestra como una línea en zig-zag. Las funciones de los diferentes dominios se indican abajo.

Recientemente se publicó que la estructura cristalina de la proteína E2 de BPV-1, unida a su secuencia específica de DNA, forma nuevos tipos de interacción entre dos monómeros de E2 (Hedge *et al*, 1992). En forma de dímeros, estos constituyen una estructura antiparalela de barra tipo β . Este tipo de estructura no se había observado anteriormente en un factor de transcripción eucariote y explica la gran estabilidad de los dímeros de E2 (que solo se rompen en urea 5M). Por medio de éste estudio se sabe que las proteínas E2 de papilomavirus constituyen una nueva clase de proteínas que unen DNA.

Son muchos los trabajos que muestran que E2 es un mediador de la activación de la transcripción (ver Thierry, 1993). La transactivación de la proteína E2 depende de su unión como dímero a la secuencia específica palindrómica ACCGNNNCGGT (fig 6). La cual se encuentra repetida varias veces a lo largo de todo el genoma de los papilomavirus.

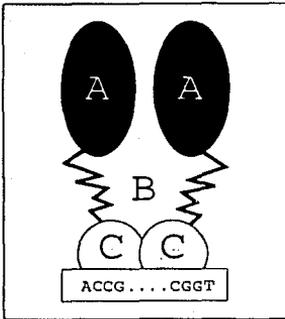


FIGURA 6. DIMERO DE E2 UNIDO A SU SECUENCIA ESPECIFICA. Se ilustra un modelo de la estructura de E2, deducido a partir de estudios estructurales y funcionales. Los dominios A y C son globulares y están separados por una bisagra flexible (B) (ver fig. 5).

Un solo sitio de unión a E2, activa la transcripción débilmente (máximo 6 veces) pero dos sitios cooperan entre si como un 'enhancer' dependiente de E2 con lo que se logra una activación de 50 a 100 veces. La mayor parte de las propiedades funcionales de E2, son compartidas por todas las proteínas E2 estudiadas hasta ahora.

Todos los papilomas contienen un transactivador codificado por el gen E2 que reconoce sus sitios de unión al DNA. Sin embargo, cuando esto

específico, pero no son transactivadoras. Pueden interferir con el efecto positivo del transactivador, ya sea ocupando su lugar, o formando heterodímeros inactivos con el mismo (ver fig. 7B).

2o. En el caso del promotor P7185 de BPV-1 existe un sitio de unión a E2 justo abajo del sitio de inicio de la transcripción (fig 7A), y se sobrelapa con el sitio para un elemento del promotor esencial para la actividad del promotor. Si a este sitio se une cualquier E2 (truncado o no) se reprime el promotor tanto *in vivo* como *in vitro*.

3o. Este importante mecanismo, fue visto por primera vez en el HPV-18 por F. Thierry y M. Yaniv, y ahora se conoce también en el HPV-16 y 11. En estos virus, existen 2 sitios de unión a E2 que están a 3-5 pares de bases de la caja TATA del promotor E6 y E7 (fig 7A). Al unirse E2 a estos sitios se reprime la transcripción. Algunos experimentos *in vitro* sugieren

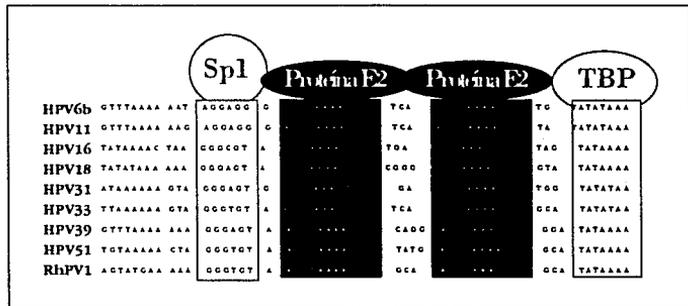


FIGURA 8. ELEMENTOS DEL DNA DE PROMOTORES E6/E7 DE NUEVE PAPILOMAVIRUS. Se muestra parte de la secuencia del promotor y se indican las secuencias específicas para el factor celular Sp1, la proteína viral E2 y el factor de unión a la caja TATA (TBP).

que obstruye la unión del complejo de preiniciación dirigido por la caja TATA (Guido *et al*, 1992). Por otro lado, la unión de E2 al segundo sitio, que está un poco más arriba de la caja, parece interferir con SP1, un factor importante para la activación de promotores tempranos, al menos en HPV-16 y HPV-18 (fig 8).

Es éste último mecanismo el que debe tomarse en cuenta para

comprender los objetivos fundamentales de la presente tesis, los cuales se explican más adelante.

Aún cuando faltan todavía cosas por entender, es claro que, la función reguladora crucial de la proteína E2 de HPV es reprimir la transcripción de los promotores E6/E7 de los genes transformantes (en los HPVs que infectan mucosas) (ver Thierry, 1993).

¿QUE ES UN RATON ATMICO ?

En realidad la historia del ratón atómico, dentro del registro científico comienza el 27 de Enero de 1968, cuando el Dr. E.M. Pantelouris reporta su artículo: "Ausencia de Timo en Mutante de Ratón" (Pantelouris, 1968).

Se conocía, desde 1962 al 'ratón desnudo' por su falta de pelo, cuando se le encontró en el Hospital Ruchill, en Glasgow, Escocia. Este mutante desencadenó varios años de intenso análisis genético. El Dr. Flanagan encontró que el ratón desnudo tenía un período de vida muy corto comparado con ratones normales, sospechó entonces que ésto era debido a una infección de *Toxoplasma gondii* y envió unos cuantos ratones a análisis con un experto en toxoplasmosis.

Algunos de estos animales cayeron en manos del Dr. Pantelouris para experimentos de infección y fué en su laboratorio donde el secreto de este ratón se detectó por primera vez: **No existe timo en los ratones desnudos homocigotos.** Rápidamente se supo que el ratón desnudo atómico tenía deficiencias inmunes más severas que el ratón neonato timectomizado (ver Rygaard, 1991).

Estos ratones contienen al gen *nu*, así nombrado por Flanagan en 1966, el cual es una mutación rara autosómica recesiva. Lo que llamaba la atención era la completa falta de pelo. El efecto doble de esta mutación, afectaba tanto al desarrollo del pelo como al del timo, lo hizo un gen de especial interés desde el punto de vista de la biología del desarrollo, así como en la comprensión de la respuesta del sistema inmune (ver Hansen, 1978).

A mediados de los 50s, Glick y sus colaboradores descubrieron que

la “Bursa de Fabricius” en pollos era la responsable de lo que hoy se conoce como “El sistema linfocítico B”. En 1961 Miller describió el efecto de un ratón recién nacido timectomizado con sus consecuencias en la inmunidad mediada por células, conocido como “El sistema celular T”. En la misma época se empezaron a reconocer estados de inmunodeficiencia en el hombre. Así el campo de interés estaba preparado para el descubrimiento del ratón atímico. El conocimiento general en inmunología básica a principios de los 70s y la disponibilidad de un animal atímico experimental representó una verdadera coincidencia fortuita (ver Boven y Winograd, 1991).

En el ratón atímico el defecto principal está, por supuesto, en las funciones de las células T. Al examinar el ducto linfóide torácico se

encuentra un muy bajo por-cen-taje de linfocitos B, las áreas dependientes de células T no existen, el complemento de linfocito B parece normal, la producción de inmuno-globulinas es escasa, la única que se produce en altas cantidades es la IgM. El sistema de macrófagos en estos ratones es muy activo, esto se debe a la presencia constante de antígeno que no puede ser combatido por el organismo por la falta de respuesta de células T y de sus anticuerpos circulantes. Existen también en los ratones atímicos células NK. El número de células T se incrementa con la edad. No se conoce con detalle la causa, pero debe ser tomado en cuenta al



trabajar con transplantes de tumor en este modelo.

El corto tiempo de vida de estos ratones, se extiende al conservarlos en condiciones especiales libres de patógenos. Si las condiciones de protección aumentan, su tiempo de vida aumenta, y aún más, si se mantienen en un

ambiente estéril, libre de gérmenes, su expectativa de vida es comparable a la de un ratón normal.

Recientemente, el ratón 'scid', ofrece un nuevo modelo de heterotransplantes. Al comparar estudios de ambos animales, el scid mejora al desnudo en general y probablemente lo irá substituyendo con el tiempo, aún cuando el ratón desnudo es hoy en día el hospedero de heterotransplantes más popular, y un muy buen modelo para los propósitos de la presente tesis.

Desde 1969, el espacio subcutáneo (sc) ha sido el sitio de implantación más popular. En un ratón sin sistema inmune, se antojaba un lugar en donde la inspección del tumor y de su crecimiento fueran sencillos, la respuesta evidente fue la inyección sc. Así los tumores se pueden colocar, como bloques sólidos, como biopsias con aguja "trocar", o como suspensiones de células.

Casi siempre, los tumores implantados subcutáneamente crecen bien circunscritos en una cápsula delgada de tejido conectivo, sin embargo algunos tumores pueden invadir músculo abdominal o hacer metástasis en nódulos linfáticos, pulmones y otros órganos.

LA TERAPIA GENICA EN LA ACTUALIDAD.

Hace mucho tiempo que la Naturaleza desarrolló métodos para introducir establemente DNA externo dentro de células animales, en forma de virus variados. La idea de reproducir éstos procesos con genes terapéuticamente valiosos, ha existido claramente aún antes de que la tecnología moderna permitiera la clonación y la manipulación de genes *in vitro*. Cuando la estructura y el ciclo de vida de los virus que se integran fué interpretada y los métodos de clonación y manipulación *in vitro* evolucionaron, la terapia génica se comenzó a ver de una manera más tangible (ver Weissman, 1992).

El tratamiento de enfermedades humanas por medio de transferencia de genes, ha pasado de ser una idea teórica, a una realidad. La primera vez

que se intentó una terapia génica en humanos fué en Septiembre de 1990. Se transfirió el gen de la 'adenosin deaminasa' (ADA) en linfocitos de una paciente que tenía un defecto letal en ésta enzima lo que le producía deficiencia inmunológica. Los resultados han sido buenos hasta hoy, y han dado la pauta para desarrollar nuevos protocolos para el tratamiento con genes.

La mayoría de los esfuerzos en terapia génica se han basado en métodos indirectos para la introducción de nueva información genética dentro de tejidos. Las células blanco se sacan del cuerpo, se infectan con vectores virales que contienen la nueva información, y son reimplantados a su lugar original (ver Wolf, 1990). Para algunas aplicaciones, la introducción directa de los genes *in vivo*, sin la necesidad de vectores virales podría ser muy útil.

Casi todos los protocolos aprobados hasta ahora por el "Comite Consejero del DNA recombinante (RAC)" y por la "Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA)", se basan en retrovirus como vectores para introducir la nueva información, por lo que es importante entender las ventajas y limitaciones de este sistema (ver Miller, 1992).

En vectores de retrovirus los genes virales se han removido o alterado para que no exista producción de proteínas del virus en las células infectadas por el vector. La introducción del DNA por medio de éste vector da como resultado la producción de viriones que con RNA del vector, que pueden infectar las células blanco, sin producir dispersión de virus después de la infección.

Estos vectores son muy eficientes para terapia génica en células que se estan replicando, pero no infectan a las células que no se dividen y no se pueden purificar homogéneamente después de su producción. Tienen que ser sometidos a muchas pruebas para asegurar que no esten contaminados con microorganismos, incluyendo retrovirus competentes, y solo haciendo pruebas en animales y humanos se puede determinar su posible efecto. Otro problema potencial es el sitio de integración de la nueva secuencia en el genoma, ya que puede ocasionar mutagénesis por inserción.

El otro método de transferencia aprobado para su uso en humanos, es la transferencia de plásmidos en liposomas directamente en células tumorales *in situ*. El uso de vesículas artificiales de fosfolípidos, como un vehículo de transporte y entrega de información genética, comenzó hace poco más de 15 años. La encapsulación dentro de una vesícula lipídica sirve para proteger al DNA a través del ambiente.

Ya que la bicapa de los liposomas es solamente de fosfolípidos, ésta interactúa y se une a las membranas celulares. Generalmente las pequeñas partículas que se pegan a cualquier célula animal, son endocitadas y destruidas. Se han desarrollado técnicas para incrementar el envío celular de los liposomas en una forma activamente biológica. Se han obtenido buenos resultados con la interferencia de las funciones normales de lisado con agentes lisosomotróficos, o utilizando lípidos catiónicos sintéticos, los cuales por su carga positiva unen DNA espontáneamente formando complejos lípido-DNA que se fusionan con la membrana plasmática (Felgner y Ringold, 1987). Una estrategia más es la encapsulación de la información con protecoliposomas que contienen proteínas virales de fusión y de unión, creando vesículas de entrega quiméricas tipo virus.

En la actualidad existen muchas otras maneras de introducir nueva información genética a un organismo vivo, incluyendo vectores de adenovirus, microproyectiles cubiertos de DNA (Williams *et al*, 1991), protocolos combinados como aerosoles con complejos DNA-liposomas (Stribling *et al*, 1992), o mejorados, como un adenovirus unido a DNA por medio de una molécula de lisina (ver Hoffman, 1992). La transferencia directa de genes en animales postnatales se ha logrado con: DNA encapsulado dentro de liposomas (Nicolau *et al*, 1983; Mannino y Gould-Fogerite, 1988), DNA coprecipitado en fosfato de calcio o DNA unido a un complejo de polilisina-glicoproteína (ver Wolf *et al*, 1990) y con un protocolo que llamó especialmente nuestra atención:

En marzo de 1990, J. A. Wolff y sus colaboradores, reportan en 'Science', su artículo **Transferencia Genética Directa en Músculo de Ratón *in vivo***. Los autores, inyectan distintas construcciones de DNA y RNA con genes reporteros (CAT, β -galactosidasa y Luciferasa),

directamente, y sin ningún mecanismo especial, a cuádriceps de ratón y encuentran en las células inyectadas, una expresión equivalente a la observada por transfección transiente de las mismas construcciones en condiciones óptimas *in vitro*. La expresión de luciferasa fué sustancial, aún 60 días después de la inyección de 100 µg del DNA. La inyección directa de DNA en un tejido accesible de manera repetida, puede ser de extrema utilidad en un protocolo de transferencia génica (Wolff *et al*, 1990).

¿CUAL ES LA PREGUNTA QUE MUEVE A ESTA TESIS?

Para poder definir el objetivo de esta tesis, es necesario reconsiderar algunos puntos importantes:

- El HPV18 está muy ligado al desarrollo del cáncer cérvico-uterino. Se ha encontrado junto con el HPV-16 en el 60-75% de todos los tumores cervicales analizados hasta ahora. Generalmente se encuentra integrado en el genoma del hospedero, de una manera particular (ver fig 3), donde los genes E6 y E7 (los oncogenes virales) siempre están intactos, el gen E2 (en el 100% de los casos para HPV-18) se encuentra roto y la proteína E2, por lo tanto, esta ausente.

- En casi todos los tumores que contienen secuencias de HPV, los oncogenes virales se expresan fuertemente.

- En HPV's ligados a cáncer genital (18,16,31), existen sitios de unión para la proteína E2 muy cercanos al inicio del promotor que regula a los oncogenes E6 y E7. La presencia de E2 en estos sitios inhibe la transcripción de E6 y E7. Parecería entonces, que la presencia de E2, es incompatible con la expresión continua de los oncogenes (fig 9).

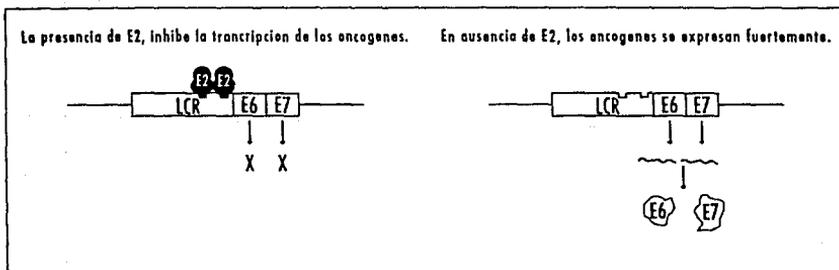


FIGURA 9. LA PRESENCIA DE LA PROTEINA E2 ES INCOMPATIBLE CON LA CONTINUA EXPRESION DE LOS ONCOGENES VIRALES E6 Y E7. Se muestra la región de control (LCR), con dos sitios de unión a E2, y los genes E6 y E7. Así como la proteína E2 y los oncogenes E6 y E7 con sus productos.

- Se ha demostrado *in vitro* que la introducción de E2 inhibe la expresión de E6/E7, y que las células HeLa pierden sus propiedades (F. Thierry *et al*, 1987).

- Las células HeLa, de origen humano, contienen secuencias de HPV-18 integradas en su genoma y carecen de la proteína E2.

- Estas células producen tumores al ser inoculadas en ratones atómicos.

- Es posible la expresión de DNA, mediante su inyección directa en músculo de ratón.

- La inyección directa de liposomas-DNA en tumores, ha sido aprobada para su uso en humanos.

- Existen plásmidos de DNA con promotores fuertes que expresan la proteína E2 muy eficientemente.

Tomando todo esto en cuenta surgen las siguientes preguntas:

ES POSIBLE INYECTAR DNA DIRECTAMENTE EN UN TUMOR DE ORIGEN HUMANO Y OBTENER EXPRESIÓN DEL MATERIAL INYECTADO?

De ser cierta la pregunta anterior, **¿SI SE INYECTA UN PLASMIDO QUE EXPRESE LA PROTEINA E2 EN UN TUMOR DE ORIGEN CERVICAL CON EL GENOMA DEL HPV-18, SE REDUCE EL CRECIMIENTO DE ESTE TUMOR?**

Así, la Hipótesis del presente trabajo es que: **EL CRECIMIENTO NORMAL DE UN TUMOR QUE CONTenga EL GENOMA DEL HPV, DEBE DISMINUIR AL ESTAR PRESENTE LA PROTEÍNA E2.**

METODOLOGIA

DISEÑO GENERAL DE LOS EXPERIMENTOS.

El diseño general de esta tesis, se puede dividir en dos grandes partes la primera enfocada a detectar la expresión de DNA inyectado en tumores de células HeLa. Utilizando ratones atímicos con tumores causados por dichas células, a los cuales se les inyectan plásmidos reporteros (CAT y β -galactosidasa). De ésta manera, a partir de extractos o cortes de los tumores se puede detectar si el DNA inyectado efectivamente se expresa, para posteriormente analizar variables como; la diferencia que existe en la expresión debido al promotor utilizado, el tiempo óptimo de expresión y la eficiencia comparada con otros metodos de introducción de material genético

La segunda parte, en general, esta dirigida a demostrar que la inyección directa de DNA que codifica para la proteína E2 de papilomavirus, reduce el crecimiento de tumores de células HeLa en ratones atímicos. Basicamente se trabaja con grupos de ratones con tumores, a los cuales se les inyecta periodicamente plásmido E2 ó algún control, el crecimiento de los tumores es medido con frecuencia, para obtener datos de su volumen tumoral. De ésta manera se pueden graficar curvas comparativas de volumen tumoral contra tiempo, de los grupos tratados con E2 con respecto a los controles y a partir de estos datos obtener el porciento de inhibición del crecimiento tumoral y por lo tanto la eficiencia del tratamiento con E2.

MAXIPREPARACION Y PURIFICACION DE PLASMIDOS.

Existen varios métodos para purificar DNA plasmídico a partir de bacterias y todos ellos incluyen invariablemente tres pasos:

- ~ Crecimiento del cultivo bacteriano.
- ~ Cosecha y lisis de las bacterias.
- ~ Purificación del plásmido.

La técnica que a continuación se describe incluye también cada uno de estos pasos y ha sido utilizada en nuestro laboratorio por varios años observandose que es un método confiable y eficiente:

- Sembrar un pié de cultivo con la cepa bacteriana portadora del plásmido de interés, en 5 ml de medio LB estéril (Bactotriptona 10%; Extracto de levadura 5%; NaCl 10%; pH 7.5) más 100 µg/ml de ampicilina.
- Crecer en agitación moderada (200 rpm) a 37°C toda la noche.
- Inocular 500 ml de medio LB con ampicilina, con los 5 ml del pié de cultivo.
- Crecer en agitación moderada hasta alcanzar una densidad óptica $D.O.600 = 0.6$
- Amplificar el plásmido con Cloranfenicol (170 µg/ml de cultivo) en agitación moderada a 32°C toda la noche.
- Centrifugar 15 min. a 5,000 rpm en rotor JA-10 (Beckman) a 4°C, para empastillar las bacterias.
- Eliminar el sobrenadante (SN).
- Resuspender en 8 ml de TS (Trizma base 50 mM pH 7.5; en Sacarosa 25%)
- Transferir 4 ml a cada tubo de polialomero para el rotor 50-Ti de ultracentrífuga
- Añadir a cada tubo 4 ml de ELT (EDTA 100 mM pH 8.0; Lisozima 2 mg/ml; Tritón 100x 0.1%).
- Agitar suavemente la mezcla, incubar a temperatura ambiente 15 min. y 20 min a 70°C
- Centrifugar durante 20 min a 40,000 rpm en rotor 50-Ti a 4°C.
- Recuperar el SN en tubos corex (30 ml) y agregar un volumen de PEG (Polietilenglicol 20%; NaCl 1M).
- Agitar suavemente e incubar 30 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 10 min a 3,000 rpm en rotor SS34.
- Eliminar SN y resuspender la pastilla en 3 ml de TE 1x (Tris 1mM; EDTA 10 mM).
- Agregar 1 volumen de Fenol (equilibrado a pH > 7.8 con Tris-HCl pH 8.0).
- Centrifugar durante 10 min a 2,500 rpm en centrífuga clínica.
- Recuperar la fase superior, y agregar 1/2 volumen de Fenol + 1/2 volumen de solución de cloroformo (cloroformo-alcohol isoamflico (24:1)).
- Centrifugar durante 10 min a 2,500 rpm en centrífuga clínica.
- ^Recuperar la fase superior, agregar 1 volumen de solución de

cloroformo.

- Centrifugar durante 10 min a 2,500 rpm en centrifuga clínica.
- Repetir varias veces desde ^, hasta no ver ninguna interfase.
- Recuperar la fase superior y agregar 1 volúmen de Acetato de Amonio 4M y 2.5 volúmenes de Etanol absoluto helado.
- Dejar a -20°C toda la noche.
- Centrifugar durante una hora a 10,000 rpm en rotor SS34.
- Lavar con Etanol 80% helado.
- Resuspender en 1 ml de TE
- Cuantificar el DNA en un gel de agarosa 1% con Bromuro de Etidio utilizando como parámetro plásmidos de los cuales se conoce exactamente su concentración.

CUIDADO DE RATONES ATÍMICOS

La condición atímica, la cual implica una inmunodeficiencia mediada por células T, provoca que el ratón desnudo sea un candidato altamente susceptible a microorganismos. Varias enfermedades infecciosas pueden interferir con experimentos en ratones desnudos. La característica más prominente de estas enfermedades, es el síndrome de 'wasting', caracterizado por pérdida de peso, piel rugosa y una postura arqueada. Este síndrome puede ser causado por algun patógeno debil, portado por animales eutímicos convencionales a los cuales no les causa ningun síntoma, más aún, ciertos tipos de bacterias, como *Staphylococcus aureus*, las cuales existen normalmente en la superficie del cuerpo humano, pueden causar enfermedades severas al ratón desnudo, aún cuando generalmente estos microorganismos son inofensivos para el hombre u otros animales.

La calidad del ambiente microbiológico del ratón desnudo, debe ser mantenida en un alto nivel, para obtener datos experimentales confiables.

- Los ratones deben ser mantenidos en un area especialmente adaptada para ellos, alejados de otros roedores y de cualquier otro animal.
- Sus jaulas deben contener un filtro aislador de microorganismos.

- Su alimento, aserrín, bebederos, jaulas, etc. deben esterilizarse.
- Se deben manipular con guantes y tapabocas estériles, en un área limpia, junto a un mechero ó en campana de flujo laminar, solamente el tiempo necesario.
- Mantenerlos en jaulas con no más de cuatro ratones.

CULTIVO Y PREPARACION DE CELULAS HeLa.

Las células HeLa, fueron las primeras células humanas de origen tumoral que lograron cultivarse continuamente. Fueron obtenidas a partir de un adenocarcinoma cervical en 1951 y deben su nombre a la paciente de la que fueron tomadas; Henrietta Lacks. Estas células contienen DNA activo de papilomavirus humano tipo 18 (HPV-18), y carecen del gen E2.

CULTIVO DE LAS CELULAS:

La línea celular HeLa utilizada en el laboratorio crece en monocapa en un soporte artificial, se usaron cajas de cultivo de poliestireno que proveen un soporte simple.

- Las células se mantienen en condiciones completamente estériles incubadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.
- Se utiliza el medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos adecuados.

PREPARACION DE LAS CELULAS PARA SU INYECCION:

- Eliminar el medio de cultivo de las cajas
- Lavar la monocapa 2 veces con PBS (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 2 mM, KH₂PO₄ 2 mM)
- Añadir 1 ml de tripsina (tripsina 0.05%, NaCl 0.08%, KCl 0.04%, dextrosa 0.1%, NaHCO₃ 0.058% y EDTA 0.02%).
- Incubar a 37 °C durante 5 min.
- Desprender las células con unos golpecitos y colocar en un tubo falcon con 1 ml de suero fetal.
- Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min. y desechar el SN.

- Resuspender bien la patilla en una cantidad conocida de medio Dulbecco.
- Tomar 50 µl de células y 50 µl del colorante vital azul de tripano.
- Cargar 10 µl de la mezcla anterior en cámara de Newbaver.
- Contar las células que no están azules (estas son las células vivas).
- Multiplicar el número obtenido por 2, ese es el número de células por 10⁴ /ml.
- Centrifugar a 3,000 rpm 3 min y resuspender en medio Dulbecco sin suero en la cantidad necesaria para tener un millón de células vivas en cada 200 µl de medio.
- Hacer alícuotas en microtubos estériles de 200 µl cada una, una por cada ratón que se va a inocular.

INYECCION SUBCUTANEA DE CELULAS EN RATONES ATIMICOS:

- Un momento antes de inyectar, cargar una alícuota de 200 µl de medio sin suero, que contenga un millón de células vivas, en una jeringa estéril y nueva de 1 ml con aguja de insulina.
- Inyectar lentamente, subcutáneamente el contenido de la jeringa en un ratón atímico, bien sujetado.
- Procurar que el sitio de la inyección sea el mismo para todos los ratones de ese experimento.

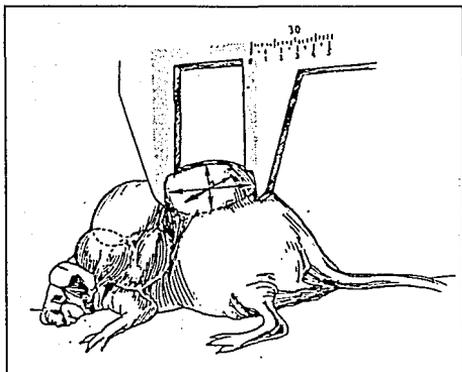
MEDICION DE TUMORES

Sin duda, la mejor manera de medir el tamaño del tumor, es por medio de su peso, el cual solo se puede obtener sacrificando al animal que tiene el tumor, este proceso no es el más apropiado para estudios que requieren una determinación periódica del tamaño del tumor *in situ* para generar una curva de crecimiento. Se han utilizado varios métodos para determinar el volumen tumoral (ver Tomayko y Reynolds, 1989).

En 1986 Enhus y cols. reportaron como estimar el área y volumen en buena relación con el peso real del tumor o masa, y en 1989, Tomayko y Reynolds, compararon diámetros, áreas y volúmenes contra peso real de

eterotransplantes subcutaneos, y concluyeros que un volumen elipsoide calculado a partir de 2 o 3 medidas lineales, consistentemente deriva en la estimacion de la masa tumoral.

Es claro que no existe ningún procedimiento estandarizado para la cuantificación del tamaño en un tumor creciente. La práctica mas común es medir el largo (L) y el ancho (W) (y la altura (H) del tumor con un "Vernier" (esquema I).



ESQUEMA I. MEDICION DE LOS TUMORES SUBCUTANEOS EN RATON ATIMICO. Se ilustra la manera de medir correctamente los tumores con un 'Vernier', el largo es siempre la dimensión más larga, el ancho es la más corta, paralela al cuerpo del ratón y la altura es el diámetro tumoral perpendicular a el largo y el ancho.

Estas medidas tomadas perpendicularmente una de otra, se usan para calcular el volumen (V). Las mediciones son periódicas, 1-2 veces por semana: con estos datos se traza una curva de crecimiento, que ilustra un patrón prominente de crecimiento y/o la respuesta del tumor a alguna terapia administrada. La curva se puede utilizar para evaluar el efecto de un agente antitumoral, comparada con una curva control de tumores sin tratar.

$$V=(W^2 \times L)/2 \quad \text{ó} \quad V=(W \times L \times H)/2$$

Este volumen (en mm³) se considera válido para estimar el peso (en mg), asumiendo una densidad de 1. Aún cuando la técnica de medición con "Vernier" es sencilla y simple de llevar a cabo, existen variaciones entre mediciones del mismo tumor, obtenidas por diferentes individuos. Por lo que es recomendable que sea la misma persona la que realice las mediciones en un mismo experimento.

Con el fin de uniformizar todos nuestros datos, y ya que la altura es sumamente difícil de medir en la primera semana de crecimiento del tumor, utilizamos siempre la fórmula $V=(W^2 \times L)/2$.

La inhibición de crecimiento tumoral (TGI), refleja el retardo en el crecimiento tumoral del grupo tratado, relativo al grupo control, el porcentaje

de TGI es muy utilizado para evaluar la eficiencia de agentes terapéuticos. Como ya se mencionó, el volumen del tumor utilizado para conocer el peso tumoral en mg (W).

$$\%TGI = 100 (\Delta W_c - \Delta W_t) / \Delta W_c$$

Donde ΔW_c es el peso medio del grupo control en un momento dado menos el peso medio del grupo control antes de empezar el tratamiento. Y ΔW_t , es lo mismo pero del grupo tratado.

El porcentaje de T/C (Tratado/Control) es lo que falta en porcentaje de %TGI para llegar a 100, esta medida es muy utilizada por varios grupos, un %T/C menor implica un mejor tratamiento. Dependiendo del grupo que lo reporte existen diferentes parámetros para determinar la eficiencia de un tratamiento tomando en cuenta el %T/C, muchos declaran actividad efectiva del tratamiento con un %T/C menor o igual a 50% y otros cuando este es menor o igual a 20 ó 10% (ver Houchens, 1991).

Algunos agentes terapéuticos son tan eficientes que inducen regresión tumoral, la medición para calcular el % de regresión (%Reg) es la siguiente:

$$\%Reg = 100 (W_o - W_i) / W_o$$

Donde W_o es el peso del tumor el día de inicio del tratamiento y W_i el peso del tumor en un tiempo determinado.

INYECCION DE DNA EN LOS TUMORES.

METODO DE INYECCION DIRECTA:

- Preparar en un eppendorf estéril la cantidad de DNA que se va a inyectar, en 200 μ l del amortiguador adecuado para cada experimento.
- Cargar cuidadosamente éste DNA en una jeringa nueva y estéril de 1 ml con aguja para insulina.
- Inyectar lenta y cuidadosamente en el tumor del ratón.

METODO DE INYECCION CON LIPOSOMAS:

- Realizar una mezcla DNA-Lipofectin (1:1) con: 200 µg de DNA en 10 µl de TE + 90 µl de medio sin suero; 100 µl de lipofectin (1 µg/µl).
- Incubar la mezcla 15 min. a temperatura ambiente.
- Cargar cuidadosamente la mezcla DNA-lipofectin en una jeringa nueva y estéril de 1 ml con aguja para insulina.
- Inyectar lenta y cuidadosamente en el tumor del ratón.

METODO DE INYECCION CON FOSFATO DE CALCIO:

- Tomar 200 µg de DNA en 10 µl de TE.
- Agregar 170 µl de HEBS (NaCl 4 g; KCl 0.185 g; NaHPO₄. 2H₂O; 0.0625 g; glucosa 0.05 g; H₂O 450 ml; pH 7.05).
- Agitar con vortex pausadamente durante 10 min. a temperatura ambiente.
- Agregar 10 µl de CaCl₂ 2M (estéril).
- Agitar con vortex pausadamente durante 10 min a temperatura ambiente, hasta obtener una mezcla opalescente.
- Cargar cuidadosamente la mezcla DNA-Calcio en una jeringa nueva y estéril de 1 ml con aguja para insulina.
- Inyectar lenta y cuidadosamente en el tumor del ratón.

METODOS DE TRANSFECCION DE CELULAS

DIRECTO:

- Lavar células en 3 ml de medio sin suero.
- Poner 250 µl de Medio sin suero.
- Agregar DNA (5 µg de plásmido RSV-CAT, 5 µg de plásmido pBR322) gota a gota dibujando círculos en la caja de cultivo.
- Incubar a 37°C con 5% de CO₂.
- Cada 15 min. y durante 2 1/2 horas agitar suavemente la caja para bañar las células con el medio que contiene el DNA.
- Agregar 5 ml de medio con 10 % de suero Fetal Bovino.
- Incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 18 horas.

CON LIPOSOMAS:

- Realizar una mezcla DNA-Lipofectin (1:1), con: 5 µg de plásmido RSV-CAT + 5 µg de plásmido pBR322 en 50 µl de agua bidestilada, desionizada esterilizada (BdDE) ; 20 µl de lipofectin (1 µg/µl) en 50 µl de agua BdDE.
- Incubar ésta mezcla durante 15 min. a Temperatura Ambiente.
- Lavar células con 3 ml de medio sin suero.
- Agregar la mezcla de DNA-Lipofectin
- Incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 22 hrs
- Agregar 3 ml de medio + 10% de Suero Fetal Bovino
- Incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 18 horas.

CON CRISTALES DE DNA/ FOSFATO DE CALCIO:

- Agregar a la caja de cultivo DNA plasmídico (5 µg de RSV-CAT + 5 µg de pBR322) en 425 µl de buffer HEBS (NaCl 4 g; KCl 0.185 g; NaHPO₄. 2H₂O 0.0625 g; glucosa 0.05 g; H₂O 450 ml; pH 7.05) y 25 µl de CaCl 2M.
- Agitar 3 veces con pausas de 10 min.
- Incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 18 hrs. para permitir la adsorción del DNA plasmidico.
- Eliminar el medio y lavar con 5 ml de PBS.
- Añadir medio fresco con 10% de suero.
- Incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 18 hrs.

ENSAYO PARA DETECTAR β-GALACTOSIDASA EN CORTES DE TUMOR

El gen lacZ de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), codifica para la hidrolasa β-D-galactosidasa (β-gal), y ha sido utilizado en una gran variedad de sistemas, incluyendo bacterias, levaduras y células de mamíferos. Los primeros 27 aminoácidos de la proteína se pueden substituir, sin afectar la actividad enzimática de la misma, permitiendo fusiones con

otras secuencias genéticas. Existen varios sustratos cromogénicos y fluorogénicos así como ensayos bioquímicos que permiten una detección rápida y sensible para detectar β -gal (es posible detectar tan poco como cinco moléculas en una célula viable).

Particularmente, el ensayo dex-gal, se utiliza para localizar actividad de β -gal en células fijadas o en secciones finas de tejido, ya sea por microscópio de luz o por microscopía electrónica.

El sustrato, 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactosidasa (X-Gal) es hidrolizado por β -galactosidasas para generar galactosa y moléculas de indoxyl solubles las cuales se convierten en índigo insoluble. El profundo color azul generado por la hidrólisis del X-Gal por β -gal facilita la localización celular de la actividad de β -gal. El ensayo X-Gal, fué realizado en tumores de origen humano, crecidos en ratón atómico: (MacGregor *et al*, 1987)

- Sacar cuidadosamente el tumor subcutaneo del ratón.
- Fijar 60-90 minutos (2% para-formaldehído; 0.2% glutaraldehído; MgCl₂ 2 mM; en PBS pH 7.3)
- Lavar dos veces durante 5 minutos (PBS; 2mM MgCl₂)
- Saturar en solución de sacarosa (PBS; 30% sacarosa; 2mM MgCl₂)
- Congelar en 'Tisue-Tek' (compuesto o.c.t.: Miles™), en nitrógeno líquido.
- Cortar secciones de 10 micras de espesor en el crióstato.
- Dejar secar los cortes durante 30 min a temperatura ambiente.
- Lavar (PBS, MgCl₂ 2 mM; 0.02% NP-40; 0.01% Deoxicolato de Na) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Refijar durante 5 min. a temperatura ambiente (misma solución fijadora).
- Lavar durante 5 min. a temperatura ambiente.
- Teñir en cámara humeda de 12 a 36 horas a 37°C (PBS; 1 mg/ml x-Gal; 0.01% Deoxicolato de Na; 0.02% NP-40; MgCl₂ 2 mM; K₃Fe(CN)₆ 5 mM; K₄Fe(CN)₆ 5mM).
- Observar en microscópio de luz.

ENSAYO CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa) EN EXTRACTOS DE TUMORES Y EN CELULAS EN CULTIVO.

El gen CAT es el reportero más utilizado para ensayos indirectos de actividad de un promotor en células de mamífero. Fué derivado originalmente del elemento transponible Tn9 de *E. coli* y confiere resistencia a cloranfenicol. La enzima CAT modifica e inactiva el cloranfenicol acetilándolo.

Se han desarrollado varios ensayos para cuantificar la actividad de CAT, incluyendo el que utilizamos nosotros que consiste en una 'incubación de extractos con cloranfenicol marcado con ¹⁴C: en éste ensayo, las modificaciones del cloranfenicol se miden en cromatografía de capa fina en sílica gel, la cuál separa a los derivados mono y diacetilados del cloranfenicol, de la forma no modificada. La sílica gel se expone en placas de rayos-X, las regiones de la sílica corresponden a las manchas en la placa, la cantidad de radiactividad se mide con un contador de líquido de centelleo cortando las manchas correspondientes de la sílica.

PREPARACION DE EXTRACTOS PARA REALIZAR EL ENSAYO CAT A PARTIR DE TUMORES CRECIDOS EN RATONES ATOMICOS:

- Sacar cuidadosamente el tumor subcutaneo del ratón.
- Cortar con un bisturi en 2-3 pedazos.
- Congelarlo inmediatamente en Nitrógeno líquido.
- Guardar a -70°C.
- Colocar los tumores en 300 µl de Tris 250 mM pH 8; 15% glicerol; Ditiotrietol (DTT) 5 mM.*
- Homogenizar en politrón con ciclos de 20 segundos * .
- Congelar-Descongelar 6 veces, pasando de un baño a 37°C a una mezcla de hielo seco-etanol, para lisar las células y liberar los compuestos de su interior.
- Centrifugar durante 10 min. a 4°C en microcentrífuga a 12,000 rpm.*
- Recuperar el sobrenadante (SN)* y calentarlo 10 min. a 65°C, para inactivar a las acetilasas.
- Centrifugar durante 5 min. a 4°C en microcentrífuga a 12,000 rpm.

*

- Recuperar el SN*, tomar una alícuota de 3 µl para realizar un ensayo Bradford. (Lo recuperado en éste punto es el extracto que se utiliza para el ensayo).

* Realizar en cuarto frío (4°C).

PREPARACION DE EXTRACTOS PARA REALIZAR EL ENSAYO CAT A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES:

- Lavar las monocapas con TD (NaCl 137 mM; KCl 5 mM; Na₂HPO₄ 0.7 mM; Tris-base 25 mM) a temperatura ambiente.
- Agregar 1 ml de TE frío (4°C) y raspar las células con un fragmento de hule estéril, recuperar el contenido en tubos Eppendorf.
- Centrifugar 1 min. en centrífuga Eppendorf a 4°C.
- Eliminar el SN, resuspender las pastillas en 200 µl de Tris 250 mM pH 8; 15% de glicerol; Ditiotrietol 5 mM.
- Congelar-Descongelar 6 veces, pasando de un baño a 37°C a una mezcla de hielo seco-etanol, para lisar las células y liberar los compuestos de su interior.
- Centrifugar durante 10 min. a 4°C en centrífuga Eppendorf a 12,000 rpm.
- Recuperar SN (Lo recuperado en éste punto es el extracto que se utiliza para el ensayo).

ENSAYO BRADFFORD PARA CUANTIFICAR PROTEINA TOTAL DE LOS EXTRACTOS:

- Realizar una curva de albúmina diluída en 100 µl Tris 250 mM pH 8; 15% de glicerol; Ditiotrietol 5 mM (TGDTT), abarcando de 0 a 40 µg de proteína (albúmina), en 5-6 muestras diferentes.
- Tomar 3 µl de extracto y 97 µl de TGDTT.
- Agregar a todas las muestras 900 µl de Reactivo Bradford.
- Leer las densidades ópticas (DO) de las muestras, en espectrofotómetro a 595 nm, tomando como blanco la muestra de 0 µg de proteína.
- Con los datos obtenidos de DO en la curva de albúmina trazar una curva de DO contra µg de proteína.

- Extrapolar las DOs de las muestras de los extractos en ésta curva, obteniendo los μg de proteína total en cada extracto.

ENSAYO CAT:

- Utilizar la mayor cantidad de extracto normalizando proteína de todas las muestras que se van a comparar.
- Completar a 300 μl con Tris 250 mM pH 8; 15% glicerol.
- Añadir 8 μl de Acetil Coenzima-A (ACoA) 20 mM y agitar fuertemente.
- Agregar 2.5 μl de Cloranfenicol marcado con ^{14}C (25 uCi/ml) y agitar vigorosamente.
- Incubar 1 hora a 37°C.
- Añadir 8 μl de Acetil Coenzima-A (ACoA) 20 mM y agitar fuertemente •.
- Agregar 2.5 μl de Cloranfenicol marcado con ^{14}C (25 μCi / ml) agitar vigorosamente •
- Incubar 1 hora a 37°C •.
- Parar la reacción con 300 μl de Acetato de Etilo (99.5%).
- Centrifugar 10 min en microcentrifuga a 4°C.
- Recuperar la fase orgánica (superior) en la que se encuentra el cloranfenicol marcado y sus formas acetiladas.
- Evaporar el Acetato de Etilo 1 hora en centrifuga con vacío o toda la noche en una campana de extracción apagada.
- Resuspender bien, en 10 μl de Acetato de Etilo.
- Colocar las muestras gota a gota en una placa de sílica gel.
- Saturar una cámara con cloroformo metanol 19:1, y colocar en ella la placa de sílica gel, de ésta forma el cloranfenicol acetilado se separa en la cromatografía del no acetilado.
- Exponer la cromatografía en una placa de autoradiografía durante 2 días. Los sitios marcados radioactivamente velan la placa, permitiendo distinguir entre las formas acetiladas y las no acetiladas del cloranfenicol marcado.
- Después de revelar la placa, la cromatografía sílica gel se recorta para cuantificar cada muestra en líquido de centelleo (PPO 5 g/l; POPOP 0.3 g/l), para saber el porcentaje de cloranfenicol acetilado.
 - -Solamente para las muestras provenientes de tumor.

RESULTADOS Y DESARROLLO DEL PROYECTO

PRODUCCION DE TUMORES HUMANOS DE ORIGEN CERVICAL EN RATONES ATIMICOS.

Para encaminarnos a cumplir nuestros objetivos principales, partimos de un punto básico, y extensamente reportado en la literatura, pero que nunca habíamos confirmado en el laboratorio: El desarrollo de tumores en ratones atímicos a partir de la inyección subcutánea (sc) de células de origen tumoral humano. En éste caso de células HeLa, provenientes de un adenocarcinoma.

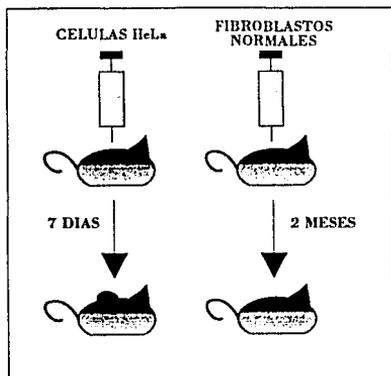


FIGURA 10. Experimento para evaluar la tumorigenicidad de dos tipos de células humanas.

Como se muestra en la figura 10, realizamos un ensayo tomando 2 grupos de ratones atímicos (*nu/nu*), de 4 miembros cada uno. El primer grupo fué inoculado subcutáneamente con 1×10^6 células HeLa y el segundo grupo (control) con la misma cantidad de fibroblastos normales que provienen de un tumor benigno de mama. La aparición de algún tumor se detectó por observación y palpación del sitio de inoculación 2-3 veces por semana.

El grupo inyectado con células HeLa desarrolló tumores palpables en 3-4 días y visibles en 7 días, en el sitio de inoculación. Los tumores aumentaban de tamaño con respecto al tiempo (ver fig 11). El grupo control no desarrolló ningún tipo de tumor aún después de 2 meses.



FIGURA 11. EVOLUCION DE LOS TUMORES DE CELULAS HeLa EN RATONES ATIMICOS. Se muestra el crecimiento de tumores producidos por la inyección subcutánea de células HeLa. A.- 2 días; B.- 18 días; C.- 35 días, después de la inyección.

INYECCION DIRECTA DE DNA EN LOS TUMORES.

Para responder si es posible inyectar DNA directamente en un tumor y obtener expresión detectable de éste, inyectamos tumores con genes que codifican para proteínas que sabemos como detectar. Tomamos como referencia el artículo publicado por Wolf y colaboradores en 1990, donde inyectan directamente y sin ningún mecanismo especial, plásmidos con genes reporteros de Luciferasa, β -galactosidasa (β -gal) y Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT). Estos genes producen proteínas que se pueden detectar mediante técnicas estandarizadas las cuales fue posible reproducir. Partiendo de éstos datos, utilizamos el método ya reportado para músculo de ratón, con tumores de origen humano crecidos en ratones atímicos.

Se utilizó una serie de plásmidos de DNA, que tienen como gen reportero a CAT ó a Lac-Z regulado cada uno por un distinto promotor (ver tabla 2):

El promotor del virus del sarcoma de Rous (LTR), es un promotor fuerte y eficiente, dos de nuestras construcciones lo tienen, una con el gen reportero CAT (RSV-CAT) y otra con Lac-Z (RSV- β gal) los promotores de Timidín Cinasa (TK) y de SV40 (temprano) son menos eficientes, en general, que RSV y la región de control de papilomavirus 18 (LCR), arriba del gen reportero Lac-Z, construido por nosotros, es específico para células de origen epitelial (Cid-Arreguí et al, 1993).

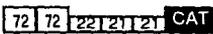
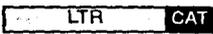
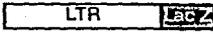
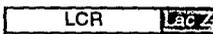
NOMBRE	ESQUEMA	PROMOTOR	PROTEINA
TK-CAT		Timidín Cinasa de HSV1	CAT
SVE-CAT		Temprano de SV40	CAT
RSV-CAT		LTR de RSV	CAT
RSV- β gal		LTR de RSV	β -gal
pLCR- β gal		LCR de HPV-18	β -gal

TABLA 2. Diferentes plásmidos con los genes reporteros CAT ó β -gal, regulados por distintos promotores.

Se inocularon trece ratones atímicos con células HeLa y 15 días después inyectamos los tumores con 200 µg de distintas preparaciones de DNA (ver tabla 3). Tres días después de la inyección extrajimos cada tumor y los procesamos para ensayo CAT o β-gal (ver metodología).

En la Tabla 3 se muestra el porciento de acetilación promedio, obtenido en los ensayos CAT de cada uno de los diferentes plásmidos. Se

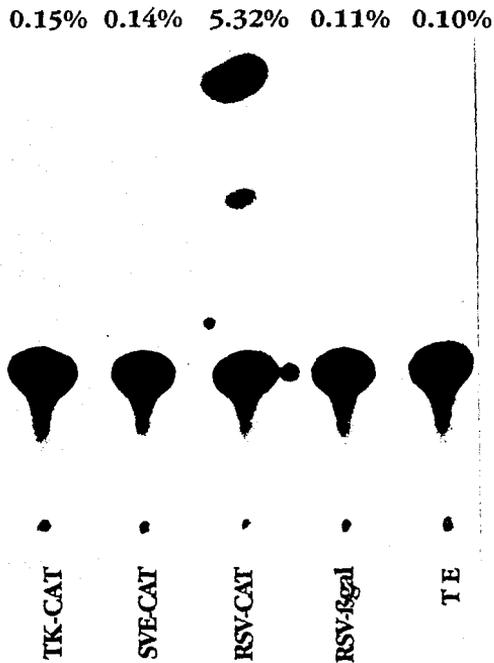


FIGURA 12. EXPRESION DEL GEN REPORTERO CAT INYECTADO DIRECTAMENTE EN TUMORES DE ORIGEN HUMANO. Autoradiografía del ensayo CAT. En la parte inferior se indican los plásmidos inyectados (ver tabla 2). Se muestra el porciento de acetilación obtenido, en la parte superior (la tabla 3 muestra el porciento de acetilación promedio de todos los ensayos realizados).

observa claramente que el LTR del virus de sarcoma de Rous (RSV), es más eficiente para expresar el DNA inyectado con el reportero CAT (figura 12 y tabla 3). Todos los otros promotores presentan niveles de expresión comparables a la de los controles (TE (solución de Tris y EDTA), RSV- β -

<u>PLASMIDO INYECTADO</u>	<u>NUMERO DE TUMORES</u>	<u>% DE ACETILACION</u>
NINGUNO (TE)	2	0.19±0.07
TK-CAT	2	0.11±0.04
SVE-CAT	4	0.21±0.07
RSV-CAT	3	4.83±0.25
RSV- β gal	2	0.13±0.02
pLCR- β gal	1	0.07±0.00

TABLA 3. Porcentaje de acetilación promedio obtenido a partir del ensayo CAT, con tumores inyectados por diferentes construcciones de DNA.

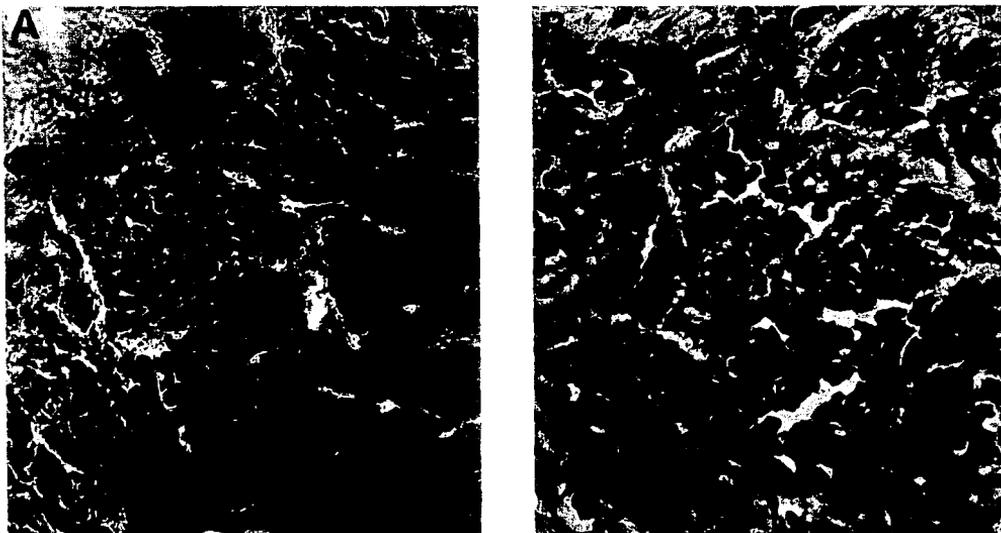


FIGURA 13. EXPRESION DEL GEN REPORTERO LAC-Z INYECTADO DIRECTAMENTE EN TUMORES DE ORIGEN HUMANO. Cortes de tumores inyectados con el plásmido RSV- β gal (A) y con TE (B), con los cuales se realizó un ensayo X-gal para determinar actividad del gen reportero β -galactosidasa (zonas azules), teñidos posteriormente con Hematoxilina-Eosina.

gal y pLCR- β gal). La eficiencia del promotor RSV se comprueba en ensayos para detectar β -gal, con el plásmido RSV- β gal (fig. 13).

TIEMPO OPTIMO DE EXPRESION DEL GEN INYECTADO

Con el objeto de conocer la cinética de expresión de DNA inyectado directamente se realizaron ensayos para evaluar la expresión del DNA a diferentes tiempos. Doce ratones atómicos se inocularon de manera habitual con células HeLa. 15 días después, se inyectaron los tumores con 200

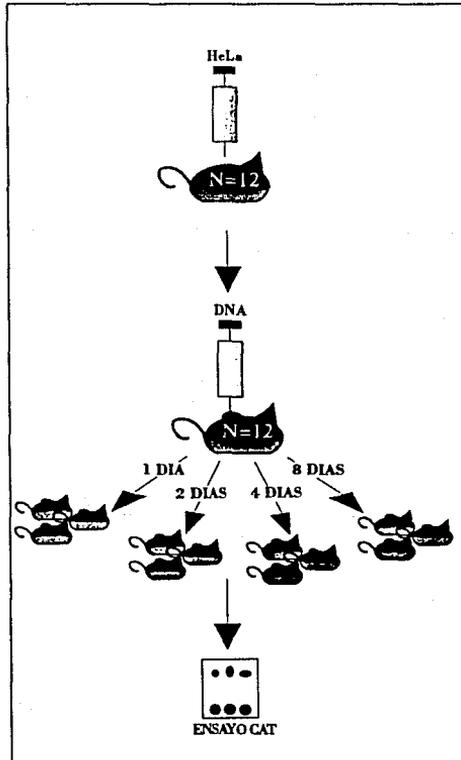


FIGURA 14. Experimento desarrollado para conocer la cinética de expresión del DNA inyectado.

μg de plásmido RSV-CAT y se procesaron 3 tumores para ensayo CAT a cuatro distintos tiempos; uno, dos, cuatro y ocho días después de la inyección con DNA (fig. 14).

En la figura 15 aparece un ejemplo de los resultados obtenidos, donde se observa claramente que ya existe expresión un día después de la inyección (1D), inclusive después de ocho días la proteína es abundante

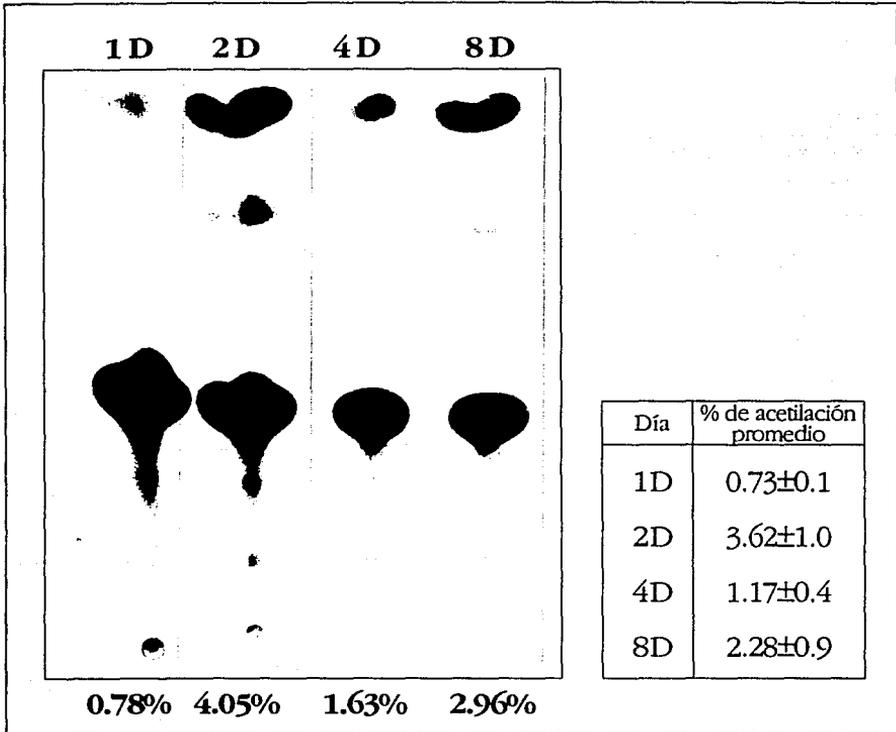


FIGURA 15. CINETICA DE EXPRESION DEL REPORTERO CAT A DISTINTOS TIEMPOS. A. Autoradiografía del ensayo CAT, mostrando la acetilación de cuatro tumores extraídos del ratón a diferentes tiempos después de la inyección directa del plásmido RSV-CAT. El número de días transcurridos a partir de la inyección se muestra en la parte superior y el porcentaje de acetilación obtenido, en la parte inferior de la figura. **B.** Tabla del porcentaje de acetilación promedio obtenido de todos los ensayos realizados.

COMPARACION DE LA EFICIENCIA DE LA EXPRESION, A PARTIR DE DIFERENTES FORMAS DE INTRODUCCION DE DNA.

Además de la metodología reportada por Wolf de inyección directa de DNA *in situ*, en la literatura se han reportado algunas otras formas de introducir información genética directamente (ver antecedentes). Una de las más utilizadas es, el uso de liposomas. En ensayos de transfección *in vitro* se utiliza frecuentemente el fosfato de calcio con lo que generalmente se obtienen transfecciones muy eficientes.

Con el objeto de determinar la eficiencia y reproducibilidad de la

inyección directa, realizamos varios ensayos, tanto en tumores como en cultivos de células HeLa, utilizando estos tres métodos de introducción de información genética; **Directo**, **Liposomas** y **Precipitados de Fosfato de Calcio** (ver metodología).

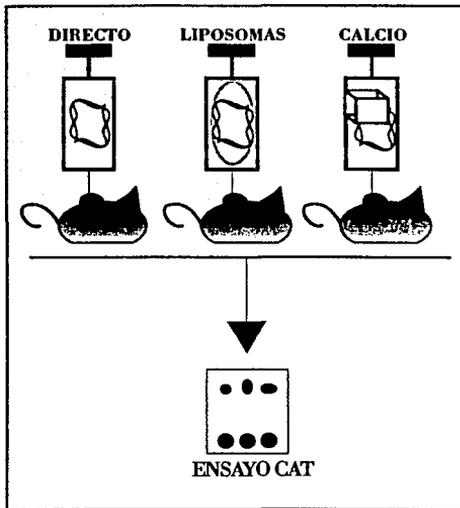


FIGURA 16. Experimento para determinar la eficiencia de la inyección directa de DNA, comparada con otros métodos.

Para este fin, se produjeron tumores en doce ratones atímicos y se formaron 3 grupos de 4 ratones cada uno. 200 μ g del plásmido RSV-CAT se inyectaron en el tumor de cada ratón, utilizando en cada grupo una diferente técnica de inyección, **Directo**, **Liposomas** y **Calcio**, como se muestra en la figura 16 (ensayo *in vivo*).

Por otro lado, cultivos de células HeLa se transfectaron, por duplicado, con el mismo plásmido utilizando estos mismos tres métodos (ensayo en cultivo), para

obtener una comparación de ensayos en cultivo.

Observamos que la inyección directa en tumores es más adecuada en ensayos *in vivo*, ya que su expresión resulta más consistente, aunque no siempre más fuerte que con liposomas, el calcio es poco eficiente comparado con los otros métodos (fig 17 y 19).

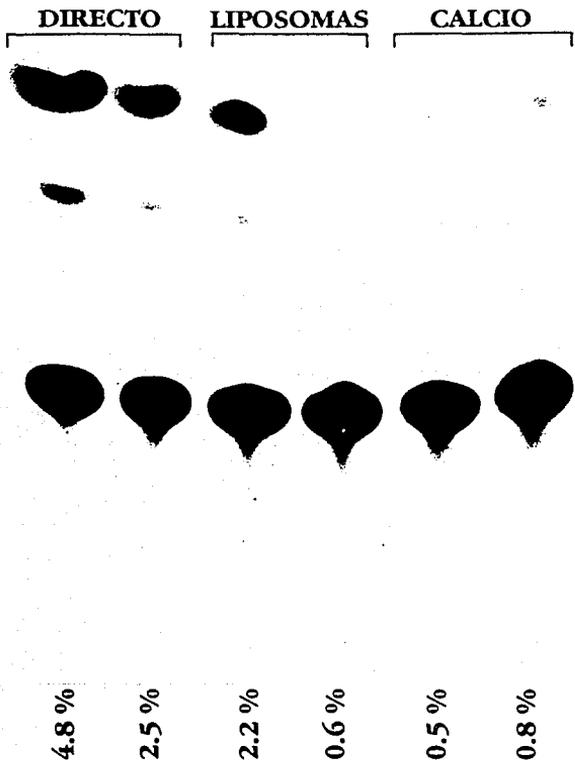


FIGURA 17. EXPRESION DEL GEN CAT INTRODUCIDO A TUMORES, UTILIZANDO DIFERENTES METODOS. Se indica en cada caso (parte superior), la técnica utilizada y el porcentaje de acetilación obtenido (parte inferior).

La figura 18 presenta la expresión *in vitro* de las tres metodologías, en donde se observa que las transfecciones con fosfato de calcio son más eficientes que con las otras dos técnicas.

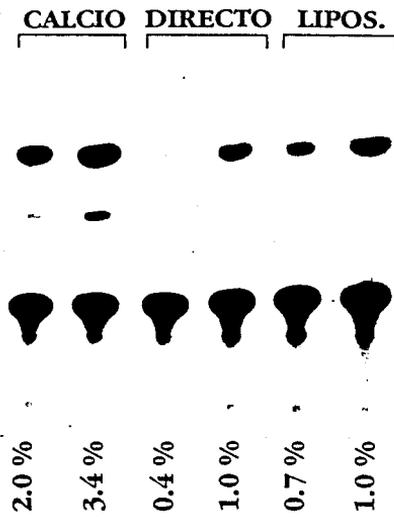


FIGURA 18. EXPRESION DEL GEN CAT TRANSFECTADO A CELULAS HeLa, UTILIZANDO TRES TECNICAS DISTINTAS. Se indica en cada caso (parte superior), la técnica utilizada y el porcentaje de acetilación obtenido (parte inferior).

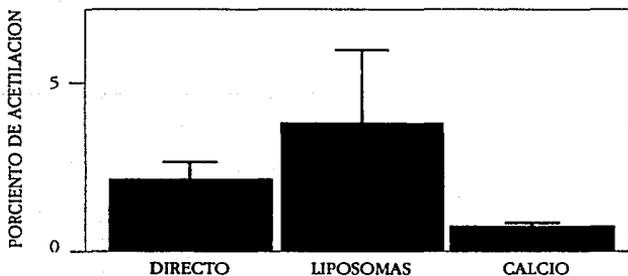


FIGURA 19. PORCIENTO DE ACETILACION PROMEDIO OBTENIDO CON DIFERENTES METODOLOGIAS PARA INTRODUCIR INFORMACION GENETICA EN TUMORES. Gráfica del porcentaje de acetilación promedio de todos los ensayos realizados \pm error estandar.

INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE TUMORES HUMANOS DE ORIGEN CERVICAL

DEBIDO A LA INYECCION DIRECTA DE PLASMIDOS QUE PRODUCEN LA PROTEINA E2.

Las células tumorigénicas que contienen integrado al papilomavirus humano tipo 18 (HPV18) son un buen sistema para evaluar el efecto que la inyección directa de DNA pueda tener sobre el crecimiento de tumores en ratón atómico, ya que la proteína viral E2 inhibe la transcripción de los oncogenes (E6 y E7) y al ser inyectado un plásmido que codifique para dicha proteína en un tumor con HPV18, se debe inhibir el crecimiento del tumor inyectado. La tabla 4 muestra un resumen de los diferentes plásmidos utilizados para éste fin.

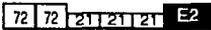
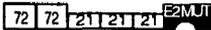
NOMBRE	ESQUEMA	PROMOTOR	PROTEINA
pC59		Temprano de SV40	E2
pC59N9		Temprano de SV40	E2 mutada
pCGE2		Citomegalovirus	E2

TABLA 4. Diferentes plásmidos que expresan el gen E2.

En todos los ensayos se inocularon subcutáneamente (sc) un millón de células HeLa (las cuales contienen varias copias de HPV18, y carecen de proteína E2). Se realizaron inyecciones repetidas de plásmidos que producen E2, o no (controles). El crecimiento de los tumores se midió dos veces por semana, con un 'Vernier', y se calculó su volumen tumoral (ver metodología). Los datos de volumen tumoral contra tiempo en días se utilizaron para trazar una curva de crecimiento tumoral comparativa para todos los ratones. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (%TGI) con el cual se obtuvo el porcentaje del grupo tratado/grupo control (%T/C), que simplemente es complementario al %TGI.

En la literatura, se han reportado parámetros arbitrarios para determinar la efectividad de un tratamiento en tumores. El NCI propone un

%T/C menor o igual a 10% para indicar actividad significativa y si el %T/C es menor o igual a 20% el tratamiento se considera de actividad moderada. Otros grupos declaran actividad eficiente con un T/C menor o igual a 50% (ver metodología) (ver Houchns y Ovejera, 1991).

LA INHIBICION DE CRECIMIENTO TUMORAL ES PROPORCIONAL A LA CANTIDAD DE DNA INYECTADO.

El plásmido pC59 (tabla 4), contiene el gen de E2 del papilomavirus bovino tipo 1 (BPV-1), regulado por el promotor del virus SV40. Su producto es una proteína que se une a la secuencia específica ACCGnnnnCGGT. Se realizó el siguiente ensayo, con el fin de evaluar el efecto de la inyección de diferentes dosis de DNA sobre los tumores:

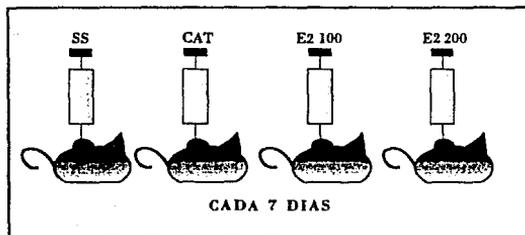


FIGURA 20. Esquema del experimento para determinar el efecto de diferentes dosis de DNA en la eficiencia del tratamiento.

Ocho ratones atímicos se inocularon con células HeLa (día 0 del experimento), a partir del día 7 del experimento y cada 7 días, 2 ratones fueron inyectados directamente en el tumor con 200 μ l de solución salina (SS); 2 ratones con 200 μ g del plásmido TK-CAT (CAT) (ver tabla 2); 2 ratones con 100 μ g del plásmido pC59 (E2 100) y 2 ratones con 200 μ g de pC59 (E2 200) (tabla 4 y figura 20).

La figura 26 I y V, muestra el %T/C obtenido al final del experimento, donde se observa que el grupo con menor dosis de DNA (E2-100, I) alcanza un %T/C de casi el doble que el grupo con doble dosis (E2-200, V). En la curva de crecimiento de volumen tumoral (figura 25,A), se compara el crecimiento de los tumores del grupo control tratado con CAT, con el crecimiento del grupo tratado con E2-200, donde después de 4 dosis (ver bolitas negras), el control alcanza casi el triple de volumen tumoral medio que el grupo tratado. La figura 21 muestra fotografías de estos mismos

VOLUMEN DE LOS TUMORES (mm³) A DISTINTOS TIEMPOS (días).

TRATAMIENTO	7*	10	12	14*	17	19	21*	24	26	*28	30
SS	31.5	64	112.5	179.5	352	384	486	448	567	597	800
	27	64	91	112.5	RIP						
CAT	64	72	112.5	162	136	269.5	433.5	526.5	632	1044	1152
	75	80	125	137.5	294	416	469.6	607	700	--	968
E2-100	16	27	31.5	72	198	111	294	234	317	253.5	512
	4	32	40	144	198	269.5	281.7	384	486	478.5	847
E2-200	22.5	40	27	48	112.5	162	144	198	211	352	352
	12	40	40.5	55	80	125	137.5	245	318.5	318.5	384

TABLA 5. Volumen de los tumores de todos los grupos, en mm³, tabulado contra el día en el que se midió el mismo. *-Día de la inyección. RIP.- Se murió. --. No determinado.

tumores al final del experimento. La tabla 5 contiene los datos del volumen de todos los tumores a diferentes tiempos.

Observamos que al inyectar mayor cantidad de plásmido E2 por dosis el efecto del tratamiento es mejor, y que el control de

SS y de un 'plásmido cualquiera' (CAT) no parecen afectar el crecimiento del tumor.

El efecto positivo de la cantidad de DNA de E2 inyectado lo observamos de nuevo en el siguiente ensayo, donde la dosis total de DNA inyectado fué similar a la dosis acumulada por el grupo E2-200 pero con

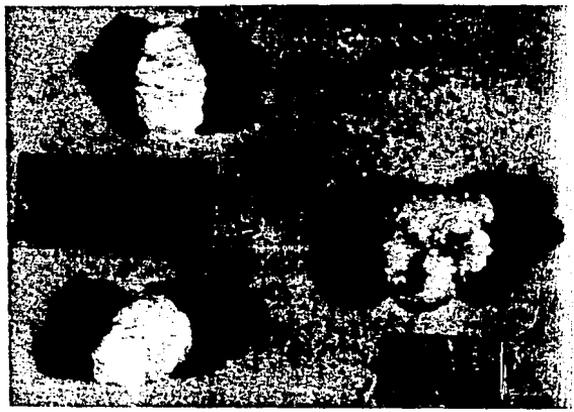


FIGURA 21. ASPECTO DE LOS TUMORES AL FINAL DEL EXPERIMENTO. E2.- Tumores inyectados con E2-200. CAT.- Tumor inyectado con el plásmido Tk-CAT (tabla 2).

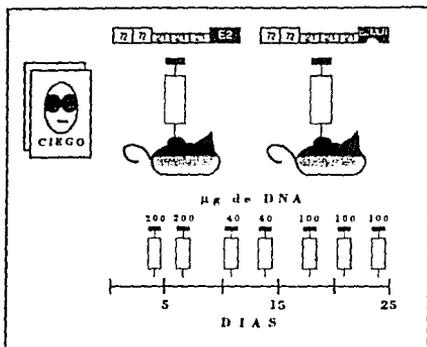


FIGURA 22. Esquema representando el experimento realizado con E2-MUT como control, realizado de forma 'doble ciego' y con múltiples inyecciones.

inyecciones más seguidas (ver figura 22). Este ensayo se llevo a cabo por triplicado utilizando como control un plásmido idéntico a pC59 (E2), pero con una mutación que origina un codón de terminación temprano (pC59N9, ver Tabla 4) (E2-MUT), dando como resultado una proteína E2 no funcional.

La figura 25 B muestra la curva de volumen tumoral contra tiempo en días de todos los ratones. Por situaciones ajenas a nuestro control,



FIGURA 23. ASPECTO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL EXPERIMENTO REALIZADO CON E2 MUTADO COMO CONTROL. A.- Fotografía de un ratón tratado con E2 mutado (parte superior), y uno tratado con E2 normal (parte inferior). Tomada el día 25 del experimento. B.- Fotografía de los tumores E2 normal (E2), y E2 mutado (mut. E2), tomada el día 25 del experimento.

uno de los ratones del grupo de E2, fué mal inyectado 3 de 7 veces, por lo que hubo que sacarlo del experimento, quedándonos con 2 ratones con E2 contra 3 ratones con E2 MUT.

Se observa claramente que el grupo de ratones inyectado con E2 MUT acumuló al final del experimento casi el triple de volumen que el grupo tratado con E2.

La figura 26 VII, muestra el %T/C del grupo inyectado con E2, éste es significativo según el parámetro arbitrario reportado el cual al final del experimento es menor al 30%. En la figura 23 se muestran ejemplos de algunos de los resultados obtenidos.

CON UNA CONSTRUCCION MEJORADA PARA PRODUCIR E2, SE OBTIENEN RESULTADOS MAS EFICIENTES.

El plásmido pCGE2 (ver tabla 4) (E2++), construido por Ustav y Stenlund, contiene el promotor del Citomegalovirus (CMV), además de una mutación dirigida que deleta al promotor interno de la proteína truncada E2-C, obteniendo un plásmido mucho más eficiente para la expresión de la proteína E2.

Catorce ratones fueron inoculados con la misma cantidad de células HeLa. A partir del día 7 del experimento y cada 7 días, 4 ratones fueron inyectados directamente en el tumor con 200 μ l de Tris EDTA (TE); 4

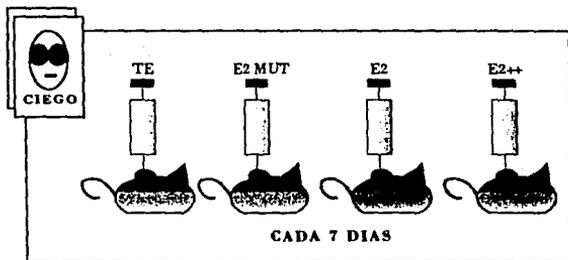


FIGURA 24. Esquema del experimento realizado con el plásmido pCGE2 (E2++).

ratones con 200 µg de el plásmido pC59N9 (E2 MUT); 2 ratones con 200 µg del plásmido pC59 (E2) y 4 ratones con 200 µg de pCGE2 (E2++) (ver figura 24).

La figura 26 IV y VI muestra el %T/C acumulado al final del experimento por los grupo tratados con E2 silvestre o con E2++ respectivamente, con una diferencia entre ellos de casi el 10%.

En la figura 25 C, se grafica la curva de volumen tumoral de los ratones contra tiempo en días, se muestra la curva del grupo tratado con E2++ graficado contra ambos controles (E2-MUT y TE), los cuales alcanzan un volumen tumoral de casi el doble, aún cuando solo se dieron 2 dosis de DNA (ver bolitas negras).

	TE (n=4)	E2-MUT (n=4)	E2 (n=2)	E2++ (n=4)
DIA 6	44.90 ± 11	44.40 ± 7	36.87 ± 3	53.00 ± 19
DIA 8	61.50 ± 15	52.47 ± 10	51.30 ± 4	49.90 ± 6
DIA 13	178.7 ± 19	97.80 ± 6	161.2 ± 41	54.00 ± 9
DIA 16	257.5 ± 46	240.5 ± 43	179.2 ± 28	84.40 ± 26
DIA 19	386.5 ± 79	335.0 ± 42	317.2 ± 48	181.0 ± 41
DIA 21	409.0 ± 79	400.0 ± 41	326.0 ± 51	219.3 ± 38

TABLA 6. Volumen medio de los tumores de los cuatro grupos indicados, en mm³ ± error estándar, contra días.

Después de la primera dosis existe regresión tumoral del volumen medio total del grupo tratado con E2++, que en este caso es del 5.7% (ver metodología). La tabla 6 muestra el volumen medio de los cuatro grupos con su error estándar a diferentes días.

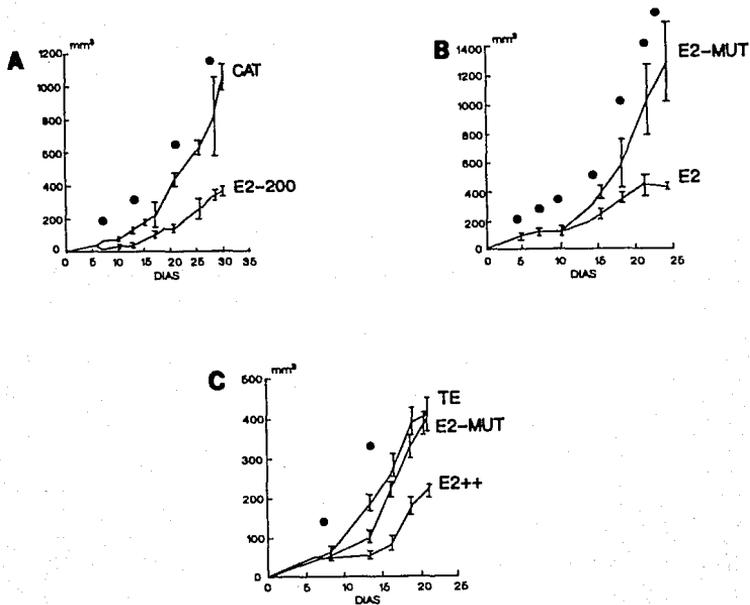


FIGURA 25. CURVAS DE CRECIMIENTO DE VOLUMEN TUMORAL CONTRA TIEMPO EN DIAS DE LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS REALIZADOS. A.- Experimento de diferentes dosis de DNA (ver fig. 20), se grafica la curva del grupo tratado con plásmido CAT, contra E2-200. B.- Experimento de multiples dosis y E2 mutado (E2-MUT) como control (ver fig 22), se grafica la curva del grupo tratado con E2 silvestre (E2) y E2-MUT. C.- Experimento con el plásmido pCGE2 (E2++), se grafican los grupos controles inyectados con TE o con E2 MUT, y el grupo tratado con E2++. Se muestran las desviaciones estándar, las bolitas indican el día de inyección.

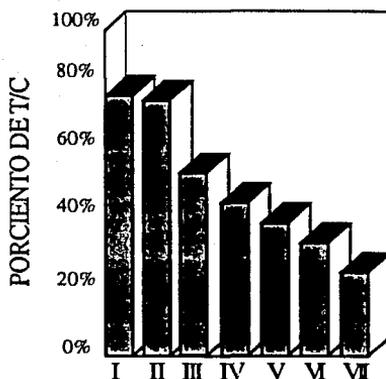


FIGURA 26. PORCIENTOS DE T/C TOTAL DE LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS REALIZADOS. I y II- 4 dosis de 100 µg del plásmido pC59 (E2). III.- 5 dosis de 100 µg de E2. IV.- 2 dosis de 200 µg de E2. V.- 4 dosis de 200 µg de E2. VI.- 2 dosis del 200 µg del plásmido pCGE2 (E2++). VII.- Múltiples dosis de E2 (ver fig. 22).

CONCLUSIONES Y DISCUSION

En los últimos 30-40 años se han desarrollado una gran variedad de modelos para el estudio de tumores. Se incluyen tumores inducidos espontánea, viral o químicamente, así como transplantes. Cada uno de estos modelos tiene utilidad para biólogos, quimioterapeutas e inmunólogos, y cada uno tiene sus limitaciones.

El modelo debe ser un sistema de prueba para distintas modalidades terapéuticas, y para su adecuada selección. El ratón desnudo ha sido utilizado exitosamente para la evaluación de varios tipos de terapia, en el Instituto Nacional de Cancer de EUA (NCI) y por una gran variedad de investigadores y compañías farmacéuticas, universidades e institutos de investigación en todo el mundo (ver Boven y Winogard, 1991).

En 1969 Rygaard y Povlsen publicaron por primera vez, que un tumor humano se puede transplantar y crecer exitosamente en un ratón desnudo. Esto desencadena una serie de artículos de diversos grupos, reportando una variedad de tumores humanos inducidos en estos animales. En poco tiempo se mostro que el modelo es aplicable para la evaluación de agentes potencialmente antitumorígenicos. Midiendo la inhibición del crecimiento tumoral, y su regresión con varios compuestos quimioterapéuticos (ver Houchens, 1991).

En 1950 el NCI inicia un programa para la identificación y evaluación de agentes antitumorales y en 1984 comienza un programa para evaluar *in vitro* drogas antitumorales, en líneas celulares analizando su respuesta a varios compuestos potencialmente antitumorígenicos para posteriormente hacerlo con heterotransplantes subcutáneos en ratón atímico. Este modelo continua siendo de gran utilidad, en él se han hecho ensayos de numerosos métodos terapéuticos, radioterapia, anticuerpos monoclonales, inmunotoxinas, interferones y otros (ver Boven y Winogard, 1991).

El primer paso en esta Tesis fué comprobar que: Nuestras células HeLa, efectivamente son tumorigénicas, ya que al ser inoculadas subcutáneamente en el ratón atímico, producen en pocos días un tumor en

el sitio de inyección. No así los fibroblastos de un tumor benigno de mama, los cuales no desarrollaron ningún tipo de tumor aún después de 2 meses a partir de su inoculación.

Basandonos en el trabajo de Wolf (1990), se inyectaron plásmidos directamente a un tumor de células HeLa, en ratón atómico. Los resultados obtenidos (ver figuras 12 y 13) demuestran que: “es posible obtener expresión detectable del plásmido inyectado”, aumentando ésta significativamente al utilizar un promotor fuerte como el promotor del virus del Sarcoma de Rous (RSV), tanto con el reportero CAT, como con β -galactosidasa.

El tiempo óptimo para detectar expresión es dos días después de la inyección del plásmido. Un día después ya se detecta proteína, y ocho días después de la misma inyección la proteína es aún abundante, (ver figura 15).

De todos los protocolos para terapia génica en humanos aceptados en la actualidad, solamente uno incluye la inyección directa de DNA plasmídico en masas tumorales *in situ*. Este es el primer intento de transferencia genética a células somáticas de un paciente, sin extraerle algunas células para la transferencia genética (*ex vivo*). Esta única metodología, consiste en la inyección directa de complejos de liposomas-DNA plasmídico a los tumores: “Si éstas técnicas de inyección directa resultaran efectivas, nos proporcionarían una alternativa mucho más simple y menos costosa que los métodos utilizados hasta ahora de transferencia genética *ex vivo*” (Miller, 1992).

Con el fin de comparar la eficiencia de distintas metodologías de introducción de DNA, tanto *in vivo* como *in vitro*, realizamos una serie de ensayos (ver figuras 16 y 17) en los que se muestra que la expresión es más consistente por el método de inyección directa de DNA que con liposomas (ver figura 19), aunque no siempre más fuerte. *In vitro*, la técnica de calcio (muy utilizada) supera en mucho a las otras dos como se observa en la figuras 18, los liposomas no muestran ninguna diferencia cuando se comparan con la transfección directa de DNA en cultivo.

El HPV-18, nos proporcionó un modelo excelente para experimentar si efectivamente es posible inyectar un DNA plasmídico con fines terapéuticos directamente a tumores. Las células HeLa, contienen más de 50 copias de HPV-18 en su genoma y carecen de la proteína viral E2.

E2 en el caso de éste papiloma tiene dos sitios de unión a DNA muy cercanos al inicio de la transcripción de los oncogenes virales (E6 y E7). Muchos datos sugieren que: "La presencia de la proteína E2 es incompatible con los oncogenes virales" (ver antecedentes).

Si tenemos una línea celular con HPV18, la cual al ser inoculada subcutáneamente en ratones atímicos origina tumores de origen humano, si sabemos que podemos inyectar DNA plasmídico directamente a éstos tumores obteniendo expresión del mismo, y además contamos con plásmidos que codifican para la proteína E2; contamos entonces con todos los ingredientes necesarios para comprobar nuestra hipótesis: El crecimiento tumoral debe disminuir al estar presente E2. Realizamos con este fin varios experimentos. Analizando todos nuestros datos podemos concluir que:

- El plásmido pC59 (ver tabla 4) produce inhibición del crecimiento tumoral la cual aumenta cuando las dosis de plásmido son mayores, cuando el tratamiento comienza tempranamente, o cuando se administran dosis con mayor frecuencia (ver figuras 25 y 26). Todo esto indica que si la relación DNA/Tumor aumenta, el tratamiento es más eficiente.

- El plásmido pCGE2 (ver tabla 4), tiene un promotor más fuerte que pC59 y como ya comprobamos, un promotor eficiente aumenta en gran medida la expresión del DNA (ver fig 12). Este plásmido resultó ser excelente, ya que después de una sola inyección del mismo se obtuvo una regresión tumoral media de casi el 6%, lo cual indica que no solo los tumores dejaron de crecer sino que disminuyeron su tamaño.

Al final del ensayo, con solamente dos dosis de pCGE2, los tumores crecieron menos de la mitad que los tumores control (ver fig. 25 C), obteniendo un porcentaje de T/C de menos del 30% (ver fig 26 VI). Esto se

considera significativo según el parámetro arbitrario reportado (ver Houchens, 1991).

- La figura 26, a manera de resumen, muestra una comparación de todos los %T/C obtenidos en los diferentes experimentos, ordenados de mayor a menor porcentaje. Aquí se aprecia claramente el efecto de las diferentes dosis de E2 y la eficiencia de E2++.

Al aumentar la cantidad de DNA por dosis, el %T/C disminuye (comparar I y II contra IV y V), más dosis de DNA reducen el %T/C (comparar I y II contra III y VII), un plásmido más eficiente en la producción de E2 es mejor aún con pocas dosis del mismo (comparar IV contra VI).

- Ninguno de los controles utilizados parece tener algún efecto sobre el crecimiento normal de los tumores. Incluyendo, inyección del amortiguador en el que se disolvía el DNA, inyección de cualquier DNA, o bien , inyección de un plásmido con una mutación que produce una proteína E2 no funcional (ver fig. 25).

El mecanismo por el cual el DNA de un plásmido logra entrar a una célula, llegar al núcleo, y traducirse a proteína, es sumamente difícil de explicar, tomando en cuenta por todo lo que tiene que pasar ese DNA. Lo cierto es que con estos experimentos, hemos visto el principio y el final de una muy complicada 'caja negra'; inyectamos DNA y detectamos la proteína para la cual codifica (al menos, en el caso de plásmidos reporteros), pero con estos datos no podemos saber nada del mecanismo de éste proceso, sólo sabemos que se llevo a cabo.

En teoría la idea de inyectar un complejo de DNA-liposomas, suena mucho más razonable, ya que los liposomas rodean completamente al material genético y se fusionan a la membrana celular, sin embargo para nuestra sorpresa esta técnica 'genial' no demostró ser mejor que la simple inyección directa (fig 17).

Al inyectar plásmido que codifica para la proteína viral E2 en un tumor de células HeLa, suponemos que la proteína E2 se une a su sitio

específico en el DNA viral el cual se encuentra integrado al genoma celular (en el LCR de HPV-18, existen cuatro de estos sitios). La presencia de E2 en los 2 sitios cercanos a la caja TATA, impiden que los oncogenes virales (E6 y E7) se transcriban, por lo que se impide la formación de oncoproteínas (ver fig 9). E7 no puede entonces inactivar a retinoblastoma, el ciclo celular no se desregula y E6 no se une a la proteína supresora de tumor p53. Viéndolo de una manera muy simple, esto impide que el tumor continúe desarrollándose al mismo ritmo.

Evidentemente no todas las células tumorales logran tener DNA dentro (ver figura 13 A), por eso la eficiencia del tratamiento aumenta con dosis mayores y más frecuentes de DNA o cuando el tumor es más pequeño, porque un porcentaje mayor de células contienen al plásmido. Así mismo, especulando, podemos pensar que E2 además de inhibir la producción de los oncogenes desencadena algún mensaje inter celular, con el cual el tumor deja de crecer, así no es necesario tener grandes cantidades de E2 ya que la señal se amplifica.

Cuando se inyectan genes *in vivo*, una de las mayores limitaciones técnicas, es que los genes no se integran al genoma celular y por lo tanto, su expresión es transitoria. Aún así se ha demostrado que existen aplicaciones clínicas utilizando este tipo de técnicas, pero éstas son limitadas. Paralelamente, las técnicas con metodologías *ex vivo* presentan un gran obstáculo técnico al transplantar las células transfectadas de regreso al organismo vivo. Se necesita el desarrollo creativo de métodos para transferencia genética que logren combinar ambos tipos de técnicas, esto es, lograr inyectar información genética *in vivo*, en la que se obtenga una expresión 'estable'.

CONCLUSIONES GENERALES

Podemos CONCLUIR, a partir de todos los datos obtenidos que:

- Las células HeLa producen tumores en ratones atímicos, los cuales aumentan de tamaño con respecto al tiempo.

- Al inyectar DNA directamente en tumores, obtenemos expresión del mismo, con promotores fuertes como el LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV).

- El tiempo óptimo en el que se expresa la proteína CAT, al inyectar un plásmido que la produce, es de 48 hrs.

- En este sistema, la inyección directa de DNA es más eficiente y constante que la inyección de complejos DNA-Liposomas o DNA-Fosfato de Calcio.

- La inyección de plásmidos que producen la proteína E2 de papilomavirus, indujo regresión tumoral, en todos los tumores en donde se inyectó, aumentando esta al aumentar la relación DNA/tumor, o al inyectar un plásmido más eficiente.

En general, se puede decir que los resultados obtenidos abren una gran cantidad de caminos, este modelo puede ser aplicable para otros tipos de células cancerígenas, y para intentar otros tratamientos genéticos. Clínicamente hablando, en un futuro, la terapia génica del cáncer cérvico-uterino puede llegar a ser una terapia complementaria.

Cuando los hermanos Wright lograron volar por primera vez, su vuelo duró solamente 12 segundos y avanzaron más o menos 75 yardas. Aún así, demostraron que El hombre podía volar. Cuidando las dimensiones, este trabajo representa los primeros 12 segundos de muchas horas. Falta mucho por hacer, pero, avanzamos 75 yardas. Proponemos a éste proyecto como un 'Modelo animal para la terapia génica del Cáncer Cérvico-uterino'.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS		PAGINA
1.	FUNCION DE LOS GENES VIRALES	4
2.	DIFERENTES PLASMIDOS, CON LOS GENES REPORTEROS CAT O β -GAL, REGULADOS POR DISTINTOS PROMOTORES.	33
3.	PORCIENTO DE ACETILACION PROMEDIO OBTENIDO A PARTIR DEL ENSAYO CAT, CON TUMORES INYECTADOS POR DIFERENTES CONSTRUCCIONES DE DNA.	35
4.	DIFERENTES PLASMIDOS QUE EXPRESAN EL GEN E2.	41
5.	VOLUMEN DE LOS TUMORES DE TODOS LOS GRUPOS EN mm 3, TABULADO CONTRA EL DIA EN EL QUE SE MIDIO EL MISMO.	43
6.	VOLUMEN MEDIO DE LOS TUMORES DE LOS CUATRO GRUPOS INDICADOS, EN mm3 \pm ERROR ESTANDAR, CONTRA DIAS.	46
FIGURAS		
1.	ORGANIZACION DEL GENOMA DE ALCUNOS PAPILOMAVIRUS.	3
2.	MAPA GENETICO DE UN PAPILOMAVIRUS GENITAL.	5
3.	PATRON CARACTERISTICO DE INTEGRACION DEL HPV18 EN TUMORES DE CELULAS HeLa.	5
4.	ESQUEMA DE LA REGION DE CONTROL (LCR) DEL HPV18.	7
5.	DOMINIOS FUNCIONALES Y ESTRUCTURALES DE LA PROTEINA E2.	7
6.	DIMERO DE E2 UNIDO A SU SECUENCIA ESPECIFICA	8
7.	MECANISMOS DE REGULACION POR E2.	9
8.	ELEMENTOS DEL DNA DE PROMOTORES E6/E7 DE NUEVE PAPILOMAVIRUS.	10

9.	LA PRESENCIA DE LA PROTEINA E2 ES INCOMPATIBLE CON LA CONTINUA EXPRESION DE LOS ONCOGENES VIRALES E6 Y E7.	17
10.	EXPERIMENTO PARA EVALUAR LA TUMORIGENICIDAD DE DOS TIPOS DE CELULAS HUMANAS.	32
11.	EVOLUCION DE LOS TUMORES DE CELULAS HeLa EN RATONES ATIMICOS.	32
12.	EXPRESION DEL GEN REPORTERO CAT INYECTADO DIRECTAMENTE EN TUMORES DE ORIGEN HUMANO.	34
13.	EXPRESION DEL GEN REPORTERO LAC-Z INYECTADO DIRECTAMENTE EN TUMORES DE ORIGEN HUMANO.	35
14.	EXPERIMENTO DESARROLLADO PARA CONOCER LA CINETICA DE EXPRESION DEL DNA INYECTADO.	36
15.	CINETICA DE EXPRESION DEL REPORTERO CAT A DISTINTOS TIEMPOS.	37
16.	EXPERIMENTO PARA DETERMINAR LA EFICIENCIA DE LA INYECCION DIRECTA DE DNA COMPARADA CON OTROS METODOS.	38
17.	EXPRESION DEL GEN CAT INTRODUCIDO A TUMORES, UTILIZANDO DIFERENTES METODOS.	39
18.	EXPRESION DEL GEN CAT TRANSFECTADO A CELULAS HeLa, UTILIZANDO TRES TECNICAS DISTINTAS.	40
19.	PORCIENTO DE ACETILACION PROMEDIO OBTENIDO CON DIFERENTES METODOLOGIAS PARA INTRODUCIR INFORMACION GENETICA EN TUMORES.	40
20.	ESQUEMA DEL EXPERIMENTO PARA DETERMINAR EL EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE DNA EN LA EFICIENCIA DEL TRATAMIENTO.	42

21.	ASPECTO DE LOS TUMORES AL FINAL DEL EXPERIMENTO.	43
22.	ESQUEMA REPRESENTANDO EL EXPERIMENTO REALIZADO CON E2-MUT COMO CONTROL.	44
23.	ASPECTO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL EXPERIMENTO REALIZADO CON E2 MUTADO COMO CONTROL.	44
24.	ESQUEMA DEL EXPERIMENTO REALIZADO CON EL PLASMIDO pCGE2 (E2++).	45
25.	CURVAS DE CRECIMIENTO DE VOLUMEN TUMORAL CONTRA TIEMPO EN DIAS DE LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS REALIZADOS.	47
26.	PORCIENTOS DE T/C TOTAL DE LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS REALIZADOS.	48

BIBLIOGRAFIA

- Bernard, BA., Bailly, C., Lenior, MC., Darmon, M. Thierry, F. and Yaniv, M. (1989). The human papillomavirus type 18(HPV-18) E2 gene product is a repressor of the HPV-18 regulatory region in human keratinocytes. *Journal of Virology* 63:4317.
- Berumen, J., (1993). Comunicación personal.
- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. and zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA and its prevalence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO Journal* 3:1151.
- Boven, E. and Winogard, B. (1991). The Nude Mouse in Oncology Research, *CRC Press*.
- Cid-Arregui, A., Auewarakul, P., García-Carrancá, A., ~~Ovseiovich, R.~~, Gaisert, H. and Gissmann, L. (1993). Characterization of the Human Papillomavirus (HPV) Type 18 Upstream Regulatory Region in Transgenic Mice. *Journal of Virology*. In press.
- Cullen, A., Reid, R., Campion, M. and Lorincz, A. (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasms. *Journal of Virology* 65:606.
- Durst, M., Kleinheinz, A., Hotz, M., and Gissmann, L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 in benign and malignant genital tumors. *Journal of General Virology* 66:1515.
- Durst, M., Croce, CM., Gissmann, L., Shwarz, E., and Huebner, K. (1987). Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *PNAS* 80:3812.
- Felgner, P.L. and Ringold, G.M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337:387.

- García-Carrancá, A., Thierry, F. and Yaniv, M. (1988).** Interplay of Viral and Cellular Proteins along the Long Control Region of Human Papillomavirus Type 18. *Journal of Virology* 62:4321.
- Giri, I. and Danos, O. (1986).** Papillomavirus genomes: from secuence data to biological properties. *Trends in Genetics*, 2:227.
- Guido, MC. (1991).** Análisis funcional de elementos reguladores de la transcripción temprana en el Papilomavirus Humano tipo 18 (HPV-18). *Tesis de Licenciatura.UMSNH.*
- Guido, MC., Zamorano, R., Garrido-Guerrero, E., Gariglio, P. and García-Carrancá, A. (1992).** Early Promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *Journal of General Virology* 73:1395.
- Ham, J., Dostani, N., Gauthier, JM. and Yaniv, M. (1991).** The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *TIBS* 16:440.
- Hansen, C.T. (1978).** The Nude Gene and its Effects. The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research. *Jorgen Fogh and Beppino C. Giovanella. Academic Press NY.*
- Hawley-Nelson, P., Androphy, EJ., Lowy, DR. and Schiller JT. (1988).** The specific DNA recognition sequence of the bovine papillomavirus E2 protein is an E2-dependent enhancer. *EMBO Journal* 7:525.
- Hedge, RS., Grossman, SR, Laimins, LA. and Sigler, PB. (1992).** Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 359:505.
- Hoffman, M. (1992).** New Vector Puts Payload on the Outside (Research News). *Science* 256:445.
- Houchens, D.P. and Ovejera, A.A. (1991).** Experimental Therapy in subcutaneous transplants. *The Nude Mouse in Oncology Research, Boven, E. and Winogard, B. CRC Press.*

- Kanda, T., Furuno, A. and Yoshiike, K. (1988). Human Papillomavirus Type 16 Open Reading Frame E7 Encodes a Transforming Gene for Rat 3Y1 Cells. *Journal of Virology* 62:610.
- Li, R., Knight, J., Bream, G., Stenlund, A. and Botchan, M. (1989). Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes Dev* 3:510.
- MacGregor, G. R. (1989). Use of E.coli lacZ (β -Galactosidase) as a reporter gene. *Methods in Molecular Biology Volume 7: "Gene expression in vivo"* Ed. E.J. Murray, Humana press Inc. N.J.
- Mannino, R.J. and Gould-Fogerite, S. (1988). Liposome Mediated Gene Transfer. *BioTechniques* 6:682.
- Matsukara, T., Kanda, T., Furuno, A., Yoshikaea, H., Kawana, T. and Yoshiike, K (1986). Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *Journal of Virology* 58:979.
- Miller, A.D. (1992). Human gene therapy comes of age. *Nature* 357:455.
- Munger, K., Phleps, WC., Bubb, V., Howley, P. and Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human Keratinocytes. *Journal of Virology* 63:4417.
- Munger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J. and Howley, P.M. (1992). Interactions of HPV E6 and E7 Oncoproteins with Tumor Suppressor Gene Products. *Cancer Surveys Volume 12: Tumor Suppressor Genes, the Cell Cycle and Cancer. Imperial Cancer Research Fund.*
- Mulligan, R.C. (1993). The Basic Science of Gene Therapy. *Science* 260:962.
- Nicolau, C., Le Pape, A., Soriano, P., Fargette, F. and Juhel, M.F. (1983). In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I. *PNAS* 88:1068.

- Pantelouris, E.M., (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature (London)* 217:370.
- Pfister, H. (1987). Human papillomaviruses and genital cancer. *Adv. in Cancer Research* 61:1630.
- Rygaard, J. and Povlsen, C.O. (1968). Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 77:758.
- Rygaard, J. (1991). History and Pathology. *The Nude Mouse in Oncology Research*, Boven, E. and Winogard, B. CRC Press.
- Schneider-Gadicke, A. and Schwartz, E. (1986). Different human cervical carcinomas cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO Journal* 5:2285.
- Shwarz, E., Freese, U.K., Gissman, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. and zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314:111.
- Sousa, R., Dostatni, N. and Yaniv, M. (1990). Control of papillomavirus gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1032:19.
- Spalholz, BA., Yang, YC. and Howley PM. (1985). Transactivation of a bovine papillomavirus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* 42:183.
- Stribling, R., Brunette, E., Liggitt, D., Gaensler, K. and Debs, R. (1992). Aerosol gene delivery in vivo. *PNAS* 89:11277.
- Thierry, F. and Yaniv, M. (1987). The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV-18 regulatory region. *EMBO Journal* 6:3391.
- Thierry, F. and Howley, PM. (1991). Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biologist* 3:90.
- Thierry, F. (1993). Proteins involved in the control of HPV transcription. *Papillomavirus Report* 4:27.

- Thompson, L (1992).** At age 2, Gene Therapy Enters a Growth Phase. *Science* 258:744.
- Tomayko, M.M. and Reynolds, P. (1989).** Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 24:148.
- Vousden, K.H., Androphy, E.J., Schiller, J.T. and Lowy, D.R. (1989).** Mutational Analysis of Bovine Papillomavirus E6 Gene. *Journal of Virology* 63:2340.
- Weissman, S.M. (1992).** Gene Therapy (Commentary). *PNAS* 89:11111.
- Williams, R.S., Johnston, S.A., Reid, M., DeVit, M.J., McElligott, S.G. and Sanford, J.C. (1991).** Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *PNAS* 88:2726.
- Wolf, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Flegner, P.L. (1990).** Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science* 247:1465.
- Wolf, J.A., Williams, P., Acsadi, G., Jani, A. and Chong, W (1991).** Condition Affecting Direct Gene Transfer into Rodent Muscle In Vivo. *BioTechniques* 11,4:474.
- zur Hausen, H. (1991).** Viruses in Human Cancers. *Science* 254:1167.