



98
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA DISMINUIR EL
CRECIMIENTO DE TUMORES CERVICO-ANALES EN HUMANO
USANDO COMO VECTOR UNA CEPA ATENUADA DEL
VIRUS DE LA VACCINIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
VERONICA IVETT RESENDIZ SANCHEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO :

Presidente : **Profa. Angelina Quintero Ruiz.**
Vocal : **Prof. Ricardo Rosales Ledezma.**
Secretario : **Profa. Marisol López López.**
1er. Suplente: **Profa. Aída Navas Pérez.**
2do. Suplente: **Profa. Alicia Cervantes Peredo.**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento
de Biología Molecular.**

ASESOR DEL TEMA :


Dr. Ricardo Rosales Ledezma.

SUSTENTANTE :


Verónica Ivett Reséndiz Sánchez

DEDICATORIAS :

A mi hijo, el más hermoso Sol de primavera.

A Ricardo, por hacerme conocer las más grandes alegrías de mi vida.

A dos grandes mujeres: mi madre y mi abuela, por su cariño, apoyo y comprensión.

A mi hermano, mi mejor amigo, por estar siempre al pie del cañón.

A Victor y a Fernando, por sus consejos y cariño desinteresado.

A Fran, porque sin su impulso todo esto no sería posible.

AGREDECIMIENTOS:

A mis tíos, Sofía y Guillermo y a mis primos Chuy, Gelo, Pepe y Genaro, por el respaldo y cariño que me han hecho sentir en todo momento.

A Consuelo Prianti Santiago, por su colaboración en la redacción de este trabajo y por su afecto y camaradería.

INDICE :

| | |
|--|-----------|
| I. Introducción. | 5 |
| A. CANCER. | 5 |
| 1. Generalidades. | 5 |
| 2. Base molecular del cáncer. | 8 |
| 3. El cáncer cérvico-uterino (CaCU): Aspectos generales. | 9 |
| B. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (HPV). | 17 |
| 1. Características generales. | 17 |
| 2. Constitución. | 17 |
| 3. Genes de los virus de papiloma. | 19 |
| 4. Posibles mecanismos de transformación por HPV | 27 |
| C. VIRUS DE LA VACCINIA. | 29 |
| 1. Características generales. | 29 |
| 2. Ciclo reproductivo del virus de la vaccinia. | 34 |
| 3. El virus de la vaccinia empleado como vector de expresión y como vacuna recombinante. | 36 |
| 4. Cepas atenuada del virus de la vaccinia. | 38 |
| II. Objetivos e hipótesis. | 41 |
| III. Justificación. | 42 |
| IV. Reactivos y medios. | 45 |

| | |
|---|-----------|
| V. Materiales. | 49 |
| A. Paciente | 49 |
| B. Células, virus y cepas | 49 |
| C. Equipo empleado | 49 |
| VI. Métodos. | 50 |
| A. PRIMERA ETAPA: Construcción de la cepa recombinante MVA-E2. | |
| 1. Amplificación mediante PCR del gen E2 del virus de papiloma bovino (BPV). | 58 |
| 2. Transformación de la bacteria <i>E. coli</i> XL1-Blue para la preparación del plásmido pIII gpt dspA. | 60 |
| 3. Aislamiento del plásmido pIII gpt dspA mediante maxipreparación. | 62 |
| 4. Gradiente de cloruro de cesio para purificación del plásmido pIII gpt dsp A. | 64 |
| 5. Preparación del plásmido pIII gpt dspA-E2. | 66 |
| 6. Preparación y purificación de stock del virus MVA. | 68 |
| 7. Preparación de fibroblastos de embrión de pollo. | 72 |
| 8. Construcción de la cepa MVA-E2. | 75 |
| 9. Análisis de la integración del gen E2 en las recombinantes E2-4 y E2-11. | 79 |

B. SEGUNDA ETAPA: Determinación de la expresión del gen E2 de la cepa MVA-E2.

| | |
|--|------------|
| 1. Descongelamiento de células. | 81 |
| 2. Pasaje de células. | 83 |
| 3. Congelamiento de células. | 85 |
| 4. Infección de células. | 87 |
| 5. Recolección de células infectadas con virus. | 89 |
| 6. Aislamiento de RNA total. | 90 |
| 7. Preparación de geles de agarosa para muestras de RNA. | 92 |
| 8. Síntesis de DNA complementario (cDNA). | 94 |
| 9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes de β-galactosidasa y E2. | 95 |
| 10. Geles de agarosa para muestras de DNA. | 97 |
| 11. Detección de la proteína E2 en lisados de células infectadas con la cepa MVA-E2. | 99 |
| 12. Gel de poliacrilamida al 12% para el análisis de radioinmunoprecipitación de la proteína E2. | 101 |

C. TERCERA ETAPA: Evaluación del efecto de la expresión del gen E2 de la cepa recombinante sobre el crecimiento de tumores de la región ge-

nital en humanos.

| | |
|--|------------|
| 1. Aislamiento de DNA de biopsias. | 103 |
| 2. Amplificación de DNA del virus de papiloma mediante PCR. | 105 |
| 3. Geles de poliacrilamida al 6% para análisis de DNA. | 107 |
| VII. Resultados. | |
| A. Resultados de la primera etapa. | 109 |
| B. Resultados de la segunda etapa. | 113 |
| C. Resultados de la tercera etapa. | 121 |
| VIII. Discusión y conclusiones. | 124 |
| IX. Siglas y abreviaciones. | 128 |
| X. Bibliografía. | 130 |

I. INTRODUCCION :

A. CANCER.

1. Generalidades:

El cáncer parece ser una enfermedad tan antigua como lo es la vida misma. Son testimonio de ello los tumores encontrados en los huesos de fósiles de dinosaurios o en las momias humanas descubiertas en Egipto y en Perú. El nombre de cáncer se inspiró en la observación de tumores de mama que, al crecer, toman la forma de un cangrejo, según explica Galeno (131-203 a. C.) en su tratado *Definitiones Medicae*.

El cáncer es un conjunto de desórdenes celulares caracterizado por la proliferación celular incontrolada; su estudio y tratamiento han sido siempre, objeto de gran interés en todas partes del mundo (17,20).

El origen de las células tumorales se encuentra en una sola célula que sufre cambios genéticos permanentes. La característica fundamental de la célula cancerosa, es la pérdida de la capacidad de controlar su crecimiento y división; las células malignas se dividen cuando y donde no

deberían hacerlo, siendo el resultado de su proliferación desorganizada, la formación de un tumor (74).

El desarrollo de un tumor maligno involucra alteraciones complejas ocasionadas por factores exógenos y endógenos; los estímulos endógenos pueden ser genéticos, hormonales o inmunológicos, mientras que los exógenos involucran una amplia variedad de elementos ambientales, tales como estímulos químicos (sustancias carcinogénicas), físicos (luz ultravioleta) y biológicos (virus).

Los procesos tumorales pueden presentar diversas manifestaciones clínicas pero se considera que todos ellos tienen causas comunes que los desencadenan. A nivel molecular, dos de los factores más importantes que intervienen en la carcinogénesis son los oncogenes y los virus (26).

En cualquier parte del cuerpo pueden originarse grupos de células que proliferen de forma anormal; de ellos, los que no pueden invadir los tejidos vecinos y permanecen estrictamente localizados reciben el nombre de tumores benignos mientras que los que se diseminan desde el lugar de origen pudiendo alcanzar el torrente sanguíneo y el sistema linfático, reciben el nombre de tumores malignos o

cánceres.

Los distintos tipos de cáncer se clasifican principalmente de acuerdo con el órgano o tejido en el que se originan y el tipo de célula a partir del cual se forman; se clasifican en tres extensos grupos: *carcinomas, sarcomas y leucemias* (74).

Los carcinomas se originan en los epitelios, capas de células que recubren la superficie del cuerpo y tapizan las diferentes glándulas; son los más frecuentes y constituyen un 90% de los cánceres. Por lo general éstos son tumores que ocurren a edad avanzada y cuya frecuencia puede incrementarse hasta mil veces entre los veinte y los sesenta años de edad. Entre ellos los más comunes son los que afectan al pulmón, al intestino grueso, a las mamas y al cuello uterino.

Los sarcomas, mucho más raros, se originan en las estructuras de sostén, como el tejido fibroso y los vasos sanguíneos. Las leucemias y los linfomas, se originan en las células hematopoyéticas de la médula ósea y de los linfonodos (20,74).

Hoy en día, el cáncer constituye una de las 5 primeras cau-

tas de defunción, tanto en países industrializados como aquéllos en desarrollo; sin embargo se ha observado que las formas predominantes de cáncer varían de un país a otro, o bien siguen una tendencia diferente. Así, por ejemplo, en Estados Unidos los tipos más comunes de cáncer son los de pulmón, el colorrectal y el de mama, en tanto que en México predominan las leucemias, los linfomas, los cánceres de próstata, pulmón y estómago, el cáncer de cuello uterino y el de mama (64,77).

2. Base molecular del cáncer:

Un tumor maligno es, como ya se mencionó, un gran conglomerado de células que crecen sin control, descendientes todas ellas de una sola célula.

Esta célula original era antes normal, pero sufrió un cambio crítico y como resultado del mismo, empezó a dividirse y a proliferar sin control. Esta única célula generará millones de células igualmente alteradas que constituyen la masa tumoral. En los cromosomas de estas células tumorales se han encontrado genes implicados en el desarrollo canceroso, llamados *oncogenes*; las proteínas para las que codifican sufren cambios (como fosforilación), ocasionando alteraciones que dan lugar a la conversión de la

célula fundadora normal en célula cancerosa (74).

Otros genes sufren modificaciones (mutaciones), dando lugar a alteraciones que conducen a la formación de tumores; a éstos genes suele llamárselos *proto-oncogenes* (74).

En la mayoría de los casos no se tiene idea de cómo estos genes contribuyen al proceso canceroso, pero se puede suponer que codifican para proteínas implicadas en la regulación del crecimiento celular.

Existen además otro tipo de genes, los denominados *anti-oncogenes*, que codifican para proteínas que regulan la función de los oncogenes y que tienen la característica de ser supresores tumorales, pues participan de alguna manera en la regulación de la proliferación celular; los más conocidos son Rb y p53 (74,95).

3. El cáncer cérvico-uterino (CaCU): Aspectos generales.

En todo el mundo, el cáncer del cuello uterino (CaCU) representa un importante problema de salud; se estima que cada año se diagnostican 500,000 nuevos casos, de los cuales mueren el 45%, por lo que ocupa el segundo lugar como causa de muerte por neoplasias entre las mujeres y es rebasado sólo por el cáncer de mama (13,63).

Entre los países industrializados y los no industrializados , la prevalencia de esta enfermedad es muy diferente, puesto que el número de casos en éstos últimos es de cuatro a ocho veces mayor.

En los países desarrollados el CaCU tiene el segundo lugar en frecuencia de cáncer en mujeres (7%), después del cáncer de mama (22%), mientras que en los países subdesarrollados sucede a la inversa: el cáncer de cérvix es el tumor que con más frecuencia se presenta entre la población femenina (24%) y el de mama ocupa el segundo lugar (15%) (64).

Debido a la aplicación masiva de campañas de detección oportuna del CaCU y a los avances terapéuticos en esta área, en los países desarrollados se ha logrado una disminución notable en la tasa de mortalidad de este padecimiento en los últimos 20 años, pero entre las mujeres jóvenes, se ha incrementado la incidencia del carcinoma *in situ* que se considera la lesión precursora del CaCU (34,35,57).

El CaCU en México constituye también un problema de salud importante, ya que representa el 20% de todos los cánceres y el 31% de los cánceres que afectan a la población

femenina, ocupando el primer lugar en incidencia y mortalidad (77).

Según datos registrados en la Dirección General de Epidemiología (Secretaría de Salud, 1991) y en el Instituto Nacional de Salud Pública (1993), en relación a otros países de Latinoamérica, México ocupa el tercer lugar en tasa de mortalidad por CaCU. La tasa de mortalidad nacional es de 9.5 por cada 100,000 mujeres, sin embargo, existe una gran variabilidad geográfica y regional en los diferentes estados de la república. Por ejemplo, en Yucatán y Nayarit es de 19.2 y 17.6 por cada 100,000 mujeres respectivamente, mientras que en Chihuahua y el Estado de México es de 4.5 y 6.1 por cada 100,000 mujeres respectivamente.

En la ciudad de México cada año se presentan 3,500 nuevos casos, la tasa de mortalidad por cáncer de cérvix es de 11 por cada 100,000 mujeres y se calcula que la tasa de incidencia en mujeres mayores de 25 años, es de 115 por cada 100,000 mujeres (77).

Todo parece indicar que las lesiones preinvasoras del cuello uterino son parte del mismo padecimiento. Dichas lesiones se presentan como una serie de cambios que

generalmente comienzan con una lesión bien diferenciada (Neoplasia Intraepitelial Cervical I -CIN I- o displasia leve), pasan por una fase menos diferenciada (CIN II o displasia moderada), luego una lesión intraepitelial indiferenciada (CIN III, la clásica displasia severa o carcinoma *in situ*), terminando finalmente en carcinoma invasor (en diversos estadios) cuando las células del epitelio cervical han atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente (57).

Desde el punto de vista clínico, los carcinomas invasores se clasifican en 4 estadios dependiendo del grado de invasión, empezando por el estadio I en el cual el cáncer ha invadido hasta 5mm más allá de la membrana basal, hasta el estadio IV, donde hay metástasis en otros tejidos. Desde el punto de vista morfológico, los tumores invasores se clasifican en: epidermoides (queratinizantes y no queratinizantes), adenocarcinomas, adenoescamosos y células pequeñas de origen neuroendócrino (57).

Comunmente toda esta gama de lesiones presentan alteraciones del fenotipo celular (alargamiento nuclear, hiperromatismo, pleomorfismo, pérdida del relieve celular, cromatina gruesa o burda y principalmente, mitosis anormales), de la arquitectura celular (lo extenso de esos

cambios de la superficie del epitelio al tejido subyacente) y del contenido del DNA celular (aneuploidía), siendo mayores las alteraciones conforme las lesiones son más avanzadas (70).

Estas lesiones se inician en la unión escamocolumnar de la zona de transformación del epitelio del cérvix, generalmente como lesiones unifocales y permanecen confinadas a ese sitio durante la fase intraepitelial (15). La invasión puede ocurrir en cualquier fase del CIN, pero es más posible que ocurra en el CIN III.

En ocasiones, las lesiones preinvasoras regresan o permanecen inalterables durante toda la vida, y sólo cierto porcentaje progresa a CaCU: 7.5% de CIN I, 15% CIN II y 25% CIN III (70), lo cual muestra que la evolución a estadios invasores no es inevitable y depende del sistema inmune del individuo. El tiempo de evolución de las lesiones que progresan de CIN I a CIN III, y de éste a carcinoma invasor, es muy variable, generalmente entre 10 a 20 años, siendo la edad promedio de las mujeres que presentan CIN I y carcinoma invasor, de 25 a 50 años respectivamente (35).

El desarrollo del cáncer invasor puede prevenirse al reali-

zar la detección, el diagnóstico y la erradicación (con tratamientos clínicos como la quimioterapia), de las lesiones precursoras.

Existen estudios que muestran que algunas enfermedades transmitidas sexualmente, pueden jugar un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad, además el comportamiento sexual está altamente relacionado con el riesgo de las mujeres a desarrollar neoplasia cervical (12,20).

Factores como el inicio de vida sexual a temprana edad, múltiples compañeros sexuales, contacto sexual con un individuo cuya pareja haya estado previamente afectada por cáncer cérvico-uterino, compañero sexual con experiencia con varias mujeres, aunado a enfermedades venéreas y compañero sexual con cáncer de pene, han sido bien documentados como factores determinantes en el desarrollo de CaCU. Los casos de cáncer que se desarrollan donde se unen los dos tipos de epitelio, el endocérvix y el cuello, están asociados a una higiene sexual deficiente (25,73,82).

Numerosas observaciones clínicas y estudios epidemiológicos sugieren además, que un factor viral, transmitido sexualmente, está involucrado en el desarrollo del CaCU

(12). Diversos virus han sido detectados como agentes infecciosos asociados al CaCU principalmente, el virus del herpes simple tipo II y más recientemente, los virus de papiloma humanos (68).

Sin embargo, desde hace algún tiempo han surgido evidencias experimentales que indican que el virus del herpes no es el principal candidato etiológico del CaCU (50, 69, 80).

El aislamiento del DNA del HPV tipo 6 de un condiloma acuminado, constituyó un gran avance respecto a la asociación entre HPV y CaCU (32). La aplicación posterior de nuevas metodologías de la ingeniería genética y de la biología molecular, tales como la clonación genética y la hibridación del DNA, permitieron aislar e identificar, de neoplasias genitales, muchos otros tipos de papilomas (34, 35).

De todos los tipos de HPV, sólo algunos de ellos (6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35) se han encontrado frecuentemente en tumores de la región genital. Los tipos 6 y 11 se han encontrado en aproximadamente el 90% de las lesiones benignas, en 25% de las lesiones precancerosas y muy raramente (2%), en las lesiones cancerosas. En 90% de los

carcinomas invasores se han encontrado los tipos 16, 18, 31, 33 y 35, siendo los más frecuentes los tipos 16 y 18 (encontrados en 50-90% de los casos; en general, el tipo 16 es 3 veces más frecuente que el tipo 18) (7, 10, 32).

Es interesante hacer notar que varios grupos de investigación, mediante hibridación *in situ*, han detectado la presencia de HPV de los tipos 16 y 18 en el 5-30% de las citologías normales (51).

Mediante estudios de seguimiento, se observó que la historia natural de las lesiones del cérvix varía de acuerdo al tipo viral que presentan inicialmente: el 46% de las lesiones con HPV-16 y el 27% con HPV-18, progresaron hasta carcinoma invasor, a diferencia de las que contienen HPV-6 y 11 que excepcionalmente lo hicieron (76,91).

Se han hecho avances importantes para entender tanto la interacción papilomavirus-célula huésped, como los mecanismos involucrados en el desarrollo del CaCU. Estos descubrimientos son de gran importancia para la creación de nuevos métodos de diagnóstico y terapia de este padecimiento.

B. VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (HPV).

1. Características generales:

El virus de papiloma humano, pertenece a la familia de los Papovavirue, la cual está compuesta de 2 géneros:

Polyoma virus y los virus de papiloma.

Los HPV se han aislado de verrugas y biopsias de tumores humanos, de los que pueden obtenerse grandes cantidades de partículas virales; sin embargo por mucho tiempo se ha intentado sin éxito, establecer un sistema de cultivo de células para poder crecer el virus de papiloma.

Dicho fracaso se debe a que la expresión del genoma del HPV es muy específica y muy restringida a los queratinocitos, a los que ha sido difícil diferenciar *in vitro*.

Los virus de papiloma son específicos para la especie y el tejido que infectan y tienen un tropismo preferencial por las células epiteliales escamosas (93).

2. Constitución:

Los viriones de los HPV están constituidos únicamente por DNA y proteínas; el DNA de doble cadena, está covalentemente cerrado y es circular, el peso molecular estima-

do por su movilidad electroforética es de 5×10^6 Daltones, lo que corresponde a 8,000 pares de bases aproximadamente. Mediante microscopía electrónica se ha determinado que el diámetro de las partículas virales es de 50-55 nm (93).

El genoma viral se encuentra compactado con histonas, formando nucleosomas y encapsulado en viriones icosaédricos con 72 capsómeros. Los viriones de diversos tipos de HPV analizados en geles de poliacrilamida-SDS, muestran una proteína mayoritaria de la cápside de 57 kDa y dos minoritarias de 53 y 43 kDa (33,65,93). Los genomas de los HPV han sido secuenciados y muestran una alta similitud, con una homología de DNA entre ellos que va desde el 45% al 85% (13,31).

Sus genes están codificados en una sola de las cadenas de DNA, lo cual indica que la transcripción es unidireccional. Esta cadena codificadora contiene 8 genes; de ellos, 6 son designados como tempranos (E) y 2 como tardíos (L). Los primeros codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2) y transformación celular (E6 y E7); los segundos codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2) (31).

El genoma viral contiene una región de control o promotor (LCR) de aproximadamente 1,000 pares de bases de DNA (1 Kb), sin ningún marco de lectura abierto (ORF, por sus iniciales en inglés) importante. En este promotor se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de la replicación (Figura A).

3. Genes de los virus de papiloma:

La tabla No. 1 (6) muestra las principales características de los genes de los virus de papiloma:

Tabla No. 1

| GEN | PESO DE | FUNCION | FUNCION DEMOSTRADA |
|-----|-------------|---|------------------------|
| | LA | | EN |
| | PROTEINA | | |
| E1 | 68 a 72 kDa | Replicación. | BPV-1, HPV-16 |
| E2 | 48 kDa | Regulador transcripcional. Replicación. | PVs, BPV-1 |
| E4 | 17 kDa | Maduración viral. | HPV |
| E5 | 7 kDa | Transformación. | BPV-1 |
| E6 | 18 kDa | Transformación. | BPV-1, HPV-16/18 |
| E6 | 18 kDa | Activador transcripcional. | BPV-1, HPV-16 |
| E7 | 16 a 20kDa | Transformación. Activador transcripcional. | HPV-16/18 HPV-16/18 |
| L1 | 56 kDa | Proteína mayor de la cápside. | PVs |
| L2 | 76 kDa | Proteína menor de la cápside. | PVs |

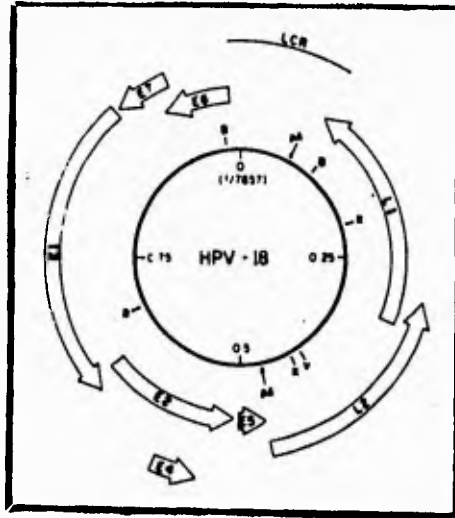


FIGURA A. Mapa genético del virus de papiloma humano tipo 18. El genoma circular de DNA de doble cadena, contiene 7887 pares de bases; posee 7 regiones de expresión temprana (E) y 2 de expresión tardía (L), además de una región de control o promotor (LCR) que contiene los elementos regulatorios de la transcripción temprana y el origen de la replicación viral (30).

Gen E2: El producto de este gen es un transregulador de la transcripción temprana, que se une al DNA y reconoce específicamente la secuencia palindrómica ACCG-NNNNN N-CGGT (sitio de unión de E2). Dicha secuencia se encuentra repetida varias veces en el LCR de todos los HPV secuenciados hasta ahora (22, 33).

La proteína E2 se une a su sitio de unión en forma de dímero y está compuesta de 3 dominios: A, B y C (Figura B).

Varios trabajos han descrito que esta proteína activa fuertemente la transcripción de los LCR de diversos tipos de promotor en bovinos y en menor grado, la de algunos promotores que no contienen su secuencia de unión (36, 37, 66, 87, 92).

Sin embargo, se encontró que el promotor que regula la expresión de los genes E6 y E7 en el HPV-18, es fuertemente reprimido por la proteína E2 en células SW13 o en queratinocitos humanos (8).

Esto se debe básicamente a la posición en que se encuentran localizados los sitios de unión de E2 con respecto a la caja TATA. Por ejemplo, de los tipos de HPV que colonizan los genitales (6, 11, 16, 16 y 33), estos sitios se ubi-

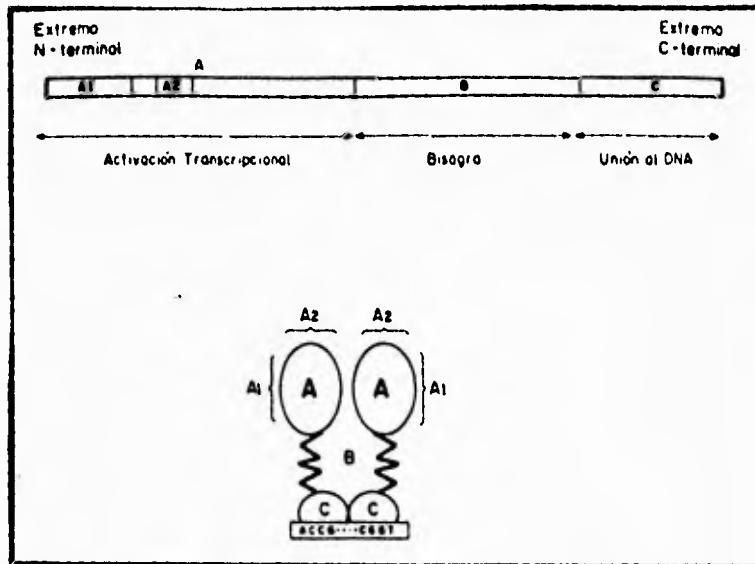


FIGURA B. Proteína E2. Esta proteína está compuesta de 3 dominios (regiones A, B y C); en la parte inferior se muestra un modelo de la estructura de E2 deducido a partir de estudios funcionales y estructurales. Probablemente, los dominios A y C son globulares y se encuentran separados por una bisagra flexible (dominio B). El dominio A contiene 2 hélices alfa (A1 y A2); el dominio C está involucrado tanto en la unión al DNA, como en el proceso de dimerización de la proteína (30).

can a menos de 70 pares de bases arriba de la caja TATA en la región promotora proximal del gen E6. Por el contrario, en otros tipos humanos y animales (BPV-1, CRPV y DPV), el sitio más cercano al promotor E6 está a 140 pb de la caja TATA (29,30).

Genes E6 y E7: Las proteínas E6 y E7 han sido implicadas en la inducción y el mantenimiento del estado transformado en células que contienen secuencias de HPV. Estas proteínas han sido encontradas en el núcleo de las células infectadas. Además ambas proteínas son transactivadores transcripcionales. El gen E6 codifica para una proteína de 21 kDa, la cual se ha encontrado en el núcleo y en la membrana plasmática, y tiene una gran afinidad por el DNA. Se ha demostrado que la proteína E6 del HPV-16 y HPV-18 interactúa con la proteína codificada por el gen supresor p53; existen además evidencias que indican que E6 pudiera promover la degradación específica de p53 por medio de la vía de la ubiquitina (3,24,46,67,78,96).

La proteína E7 es una fosfoproteína de 98 aminoácidos (14 kDa) localizada en el núcleo y el citoplasma celular, a la cual no se le ha encontrado una función enzimática intrínseca. Se ha sugerido, que su mecanismo de acción involucra la interferencia de la función de la proteína Rb

(anti-oncogen), en el control de la proliferación de las células normales. La unión de E7 a la proteína Rb pudiera explicar su función de transactivador transcripcional (86).

Contrariamente con lo que sucede con los genes E1 y E2 (ver "Posibles mecanismos de transformación por HPV"), los genes E6 y E7 no se destruyen durante la integración del DNA viral al genoma celular (75).

LCR: Se localiza entre el inicio de la región temprana y el fin de la región tardía; el extremo 5' de la cadena de DNA incluye un dominio abundante de guaninas y timinas, en virus genitales, y rico en adeninas y timinas en otros virus; este dominio contiene las señales de poliadenilación de los transcritos tardíos (31).

En el extremo 3' al final del promotor LCR se encuentra la región más conservada y contiene los sitios de unión de la proteína E2, que se encuentran localizados de una manera particular en el LCR de los tipos genitales; estos LCR presentan un doble sitio perfecto de unión justo arriba de la caja TATA. La región central del LCR, es la más variable (Figura C) (30).

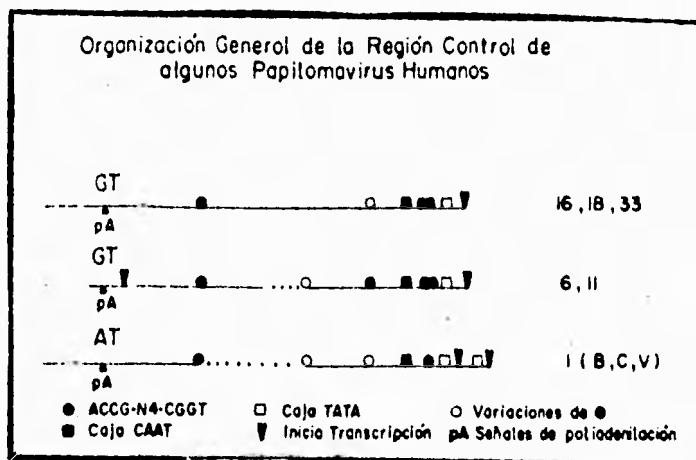


FIGURA C. Organización general del promotor (LCR) de algunos tipos del virus de papiloma humano. Se muestran los sitios de unión de la proteína E2, los cuales se encuentran localizados de una manera particular en el LCR de los tipos genitales, ya que éstos presentan un doble sitio de unión justo arriba de la caja TATA. La región central del LCR es la más variable y existe un fragmento presente únicamente en los tipos genitales (30).

4. Posibles mecanismos de transformación por HPV:

A pesar de que el posible papel de los virus de papiloma en la inducción de cáncer cérvico-uterino fue sugerido hace más de 18 años por zur Hausen (97) todavía no se sabe cómo, ni en qué momento, el virus transforma a la célula. Se sabe que los HPV-6 y 11 se encuentran en estado episomal en las lesiones benignas y precancerosas; los HPV 16 y 18 se encuentran integrados al genoma celular en las lesiones cancerosas y generalmente están amplificadas en unas 50-200 copias por célula. Esto parece indicar que la integración de los tipos 16 y 18 está relacionada con el proceso de malignización de las células normales o la progresión tumoral (30).

La integración del genoma viral al genoma celular, generalmente conduce a la pérdida de una región viral que incluye los genes E1 y E2, lo cual elimina el control negativo (unión al LCR) que el producto del gen E2 puede ejercer sobre la expresión de los genes E6 y E7. La expresión continua de estos genes provoca el crecimiento incontrolado de las células tumorales (9).

Por otro lado, parece que la pérdida del gen E2 y la libre expresión de los genes E6 y E7, no es el único mecanismo

de transformación celular, pues parece ser que ocurre también la activación de proto-oncogenes celulares en posición cis, debidas a la inserción de secuencias virales cerca de dichos proto-oncogenes (16,27), así como lesiones génicas sucesivas.

Si el cáncer genital resulta además, de la falla de los mecanismos celulares que controlan la expresión de los genes virales persistentes, aparte de una infección por HPV se requiere de otros agentes que lesionen el DNA celular como es el caso de los co-carcinógenos (virus del herpes, metabolitos mutagénicos del cigarro e inflamaciones crónicas de los genitales) encontrados en estudios epidemiológicos; ésto podría explicar los grandes períodos de latencia entre la infección primaria por el HPV y el desarrollo del tumor, y por qué el cáncer de cérvix se desarrolla sólo en un cierto porcentaje de los individuos infectados (30).

C. VIRUS DE LA VACCINIA.

1. Características generales:

El género Ortopoxvirus de la familia Poxviridae, comprende un grupo de virus bastante relacionados, los cuales son: el virus de la viruela de los monos (monkeypox virus o MPV), el de la viruela de las vacas (cowpox virus o CPV), el virus de la viruela de los conejos (rabbitpox virus o RPV), ectromelia (virus de la viruela de los ratones o mousepox virus), el virus de la variola (humanos) y el virus de la vaccinia.

Estos virus poseen una morfología similar, con genomas de DNA de doble cadena, de aproximadamente 200,000 pb de largo (125,000 kDa); todos ellos se replican en el citoplasma y no en el núcleo de la célula a la que infectan y algunos utilizan las mismas señales de regulación transcripcional que las células eucariotas.

Dos miembros del género que no existen ya en la naturaleza y con los que estamos más familiarizados son: el virus de la variola (agente etiológico de la viruela humana), y el virus de la vaccinia (prototipo de los poxvirus) (56).

Este último se usó como vacuna viva contra la viruela. Su

origen es desconocido y hay quienes proponen que se pudo haber derivado de la viruela de las vacas, de la de los caballos o de la humana (por adaptación a los animales, por hibridización con la viruela de las vacas o por cambios en los pasajes brazo-a-brazo, al vacunar contra esta enfermedad en el siglo XIX) sin embargo a ciencia cierta, no se conoce su origen (66).

La partícula viral de vaccinia está compuesta de una bicapa lipoprotéica que envuelve a un "core" bicóncavo, el cual tiene una estructura de función desconocida, denominada cuerpo lateral, en cada concavidad. El genoma, que está localizado dentro del "core", consiste de una molécula lineal de DNA de doble cadena, que contiene aproximadamente 185,000 pares de bases. Los extremos del genoma están covalentemente unidos en forma de horquilla, convirtiendo a las dos hebras de DNA en una molécula continua (4).

En lugar de histonas, existen proteínas virales que se unen fuertemente al DNA y aparentemente ayudan a mantenerlo compactado (43).

La mayoría de los genes esenciales se encuentran en la región central del genoma, la cual se encuentra altamente

conservada entre los poxvirus; los genes que no son esenciales para la replicación en cultivo celular y aquellos implicados en el rango de huésped, se encuentran cercanos a los extremos del genoma (28).

El genoma de vaccinia codifica para un número estimado entre 150 y 200 proteínas, lo cual puede atribuirse a la aparente ausencia de intrones, secuencias cortas de los promotores y al tamaño (relativamente pequeño) que presentan algunos marcos de lectura abierta (u ORFs). Al transcribir las dos cadenas de DNA del genoma, se observa de manera poco frecuente, la sobreposición de los marcos de lectura abiertos (56).

Por otro lado, el virión consta de un gran número de polipéptidos; más de 100 de ellos han sido identificados mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida-SDS e incluyen tanto proteínas estructurales, como enzimas involucradas en transcripción y modificación de mRNA (68).

Hasta el momento han sido aisladas varias enzimas del virus de vaccinia de las cuales, algunas son brevemente descritas a continuación:

- RNA polimerasa dependiente de DNA: Enzima codificada por

el virus, con un peso molecular aproximado de 500 kDa. Algunos de sus polipéptidos identificados tienen pesos moleculares de 147, 132, 34, 22, 21, 20 y 17 kDa. La enzima purificada es capaz de transcribir sólo DNA de una cadena requiriendo, para esta actividad, Mn^{2+} en lugar de Mg^{2+} (5,89).

- Complejo enzimático, aislado de las partículas de virus: Consiste de dos subunidades (una de 97 y otra de 33 kDa) y presenta actividades de RNA trifosfatasa, de RNA guaniltransferasa y de RNA guanil-7-metiltransferasa. Este complejo es el encargado de la metilación y la formación de la estructura Cap de los mRNAs de vaccinia (48,81).

- Poli(A) polimerasa: Contiene 2 subunidades de 55 y 33 kDa y fue aislada del "core" del virus; su peso molecular es de 80,000 kDa. La enzima purificada trabaja mejor con Mn^{2+} y se ha visto que adiciona residuos adenilados a los extremos 3' de polirribonucleótidos sintéticos y a fragmentos de RNA o de DNA (55).

- Nucleósido trifosfatasas DNA-dependientes: Existen varios polipéptidos en el "core" del virus que presentan esta actividad, siendo los principales dos de ellos cuyos pesos moleculares son de 61,000 kDa (conocido como Nucleó-

alido Trifosfato Fosfohidrolasa I o NPH I) y 66,000 kDa (NPH II) (62).

- DNA topoisomerasa: Polipéptido de 314 aminoácidos, es capaz de relajar las cadenas de DNA en ausencia de un co-factor energético y existen evidencias de que este enzima es esencial para el virus. Probablemente está implicada en el empaquetamiento del DNA o en otras funciones no relacionadas con la transcripción(6).

- Enzimas adicionales: Otras enzimas presentes en el "core" de vaccinia son: una proteína-quinasa cuyo peso molecular es de 62,000 kDa y que fosforila residuos de serina y treonina de 2 proteínas aceptoras de fosfato (de 11.7 y 38.5 kDa), aislados de los viriones de vaccinia (41).

Encotramos también, una enzima asociada al virión con actividades de desoxirribonucleasa y ligasa (64). Se han reportado algunas otras actividades enzimáticas presentes en extractos del "core" de vaccinia que nunca se han purificado o caracterizado y que incluyen actividades de quinasa 5'fosfato polinucleótido, endorribonucleasa y proteasa alcalina (2, 60, 66).

Además, también ha sido posible el aislamiento y purificación de proteínas conocidas como factores de transcrip-

ción (que se clasifican en tempranos, intermedios y tardíos, en base al tipo de promotor que transcriben) mediante el paso de extractos citoplásmicos de células infectadas a través de columnas de fosfocelulosa y consecuentes pasos de elución. Tal es el caso de los factores VETF (*Vaccinia Early Transcription Factor*), VITF-1 (*Vaccinia Intermediate Transcription Factor 1*) y VLTF-1 (*Vaccinia Late Transcription Factor 1*), entre otros (14, 42,53).

2. Ciclo reproductivo del virus de la vaccinia:

Los principales eventos en el ciclo reproductivo de vaccinia incluyen la adsorción y penetración del virus en la célula huésped, la expresión regulada del genoma, la replicación del DNA, el ensamblaje del virión y la diseminación del virus (53).

La entrada del virus de vaccinia en el citoplasma, involucra la fusión de éste con las membranas celulares y su consecuente internalización (18,21). Concomitantemente, ocurre la liberación de fosfolípido y del 50 % de la proteína del virión (39), dejando el "cora" del virus libre en el citoplasma (donde tendrá lugar la transcripción) (58).

Estudios de hibridación DNA-RNA indican que aproximadamente el 50% del genoma se expresa en esta etapa pre-replicativa (59). Todo parece indicar que existen cerca de 100 genes tempranos distribuidos a lo largo del genoma, muchos de los cuales ya han sido mapeados y secuenciados (60).

El inicio de la replicación del DNA y el comienzo de la expresión de los genes intermedios, son dos procesos que ocurren prácticamente a la par; para entonces, muchos de los genes tempranos ya no son funcionalmente activos (60).

Todavía no se conoce con detalle como el virus de vacinia lleva a cabo la replicación de su DNA, pero hay evidencia que indica que el virus codifica para su propia DNA polimerasa (cuyo peso molecular aproximado es de 110 kDa) y presumiblemente para algunos otros factores de replicación incluyendo una DNA topoisomerasa (6).

El término de la transcripción intermedia, marca el principio de la expresión de los genes tardíos. Los productos de la expresión de éstos últimos serán enzimas y factores de transcripción que llevarán consigo los nuevos viriones. Es importante mencionar que cada etapa de transcripción

necesita la presencia de la enzima RNA polimerasa y de diversos factores de transcripción específicos de cada etapa (es decir: factores de transcripción tempranos, intermedios y tardíos) (71,72).

El siguiente paso es al ensamblaje del virus, el cual es un proceso muy complejo que ocurre en áreas especializadas del citoplasma. Las partículas virales maduras son trasladadas de las áreas de ensamblaje a la periferia celular. Algunas de estas partículas son envueltas en la membrana de goigi modificado y así, son externalizadas (38,52).

3. El virus de vaccinia empleado como vector de expresión y como vacuna recombinante:

El virus de la vaccinia fue el primer virus animal en ser observado microscópicamente, crecido en cultivo celular, titulado adecuadamente, físicamente purificado y químicamente analizado; su interés radica en su gran capacidad para ser usado como vector de expresión de genes y vacuna recombinante (56).

Con los métodos adecuados de Ingeniería genética, es posible expresar prácticamente cualquier gen empleando

como vector el virus de la vaccinia. Como ejemplo de lo anterior, podemos citar los siguientes genes que ya han sido expresados mediante tal vector: el gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa, conocido también como CAT, proveniente de procariontes (44); genes de virus de DNA, por ejemplo, el gen del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; el de la timidin-kinasa y el de la glicoproteína D, ambos del virus de herpes simple (43, 58, 61, 63); genes de virus de RNA, como el de la hemaglutinina del virus de la influenza (64), el de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (45) y el de la glicoproteína del virus de la rabia (40); y por último, genes de protozoarios, como el que codifica para la proteína GS de *P. knowlesi* (65). En muchos de los casos, el polipéptido producido por el vector ha demostrado ser idéntico a la proteína original, se glicosila adecuadamente, se transporta a la membrana plasmática y es altamente inmunogénico (66).

Por lo que respecta a la producción de vacunas recombinantes, la Tabla No. 2, reúne a las principales vacunas recombinantes que se han probado con éxito a nivel experimental (66).

TABLA No. 2

VIRUS DE LA VACCINIA COMO VECTOR DE ANTIGENOS PARA LA FABRICACION DE VACUNAS.

| Enfermedad: | Virus causante: | Ag que expresa la vacuna recombinante |
|--------------------------------|--|---|
| Hepatitis B | Virus de la hepatitis B.(HBV) | Ag de superficie de HBV |
| Malaria | <u>P. knowlesi</u> <u>P. falciparum</u> | Proteína CS |
| Lesiones genitales. | Virus de herpes simple tipo 2 | Glicoproteína D. |
| Lesiones en cavidad oral. | Virus de herpes simple tipo 1 | Glicoproteína D. |
| Influenza. | Virus de influenza tipo A. | Hemaglutinina. Nucleoproteína Proteína de la matriz (M1). |
| Rabia. | Virus de la rabia. | Glicoproteína G. |
| Mononucleosis infecciosa. | Virus de Epstein-Barr. | gp 340 (Ag de membrana). |
| Estomatitis vesicular. | Virus de estomatitis vesicular (VSV) | Proteínas G y N. |
| Gastroenteritis transmisible . | Virus de gastroenteritis transmisible(TGEV). | Ag de superficie de TGEV |

4. Cepa atenuada del virus de la vaccinia:

Debido a que la cepa silvestre del virus de la vaccinia puede recombinarse *in vivo* con otros virus de la misma familia de los Poxvirus, su uso como vacuna recombinante y como vector de expresión, ha sido restringido por normas y regulaciones de seguridad.

Los riesgos que implica trabajar con la cepa silvestre de este virus, se ven disminuidos al mínimo si utilizar una cepa atenuada del mismo; es por eso que en el laboratorio del Dr. Ricardo Rosales, donde fue realizado el presente trabajo, se emplea para la producción de vacunas recombinantes, la cepa atenuada de vaccinia llamada MVA (*Modified Vaccinia Ankara*), la cual se derivó, como su nombre lo indica, de la cepa Ankara del virus de la vaccinia, mediante 570 pasajes sucesivos en fibroblastos de embrión de pollo (CEF) (90).

Esta cepa puede infectar a prácticamente cualquier tipo de célula, pero es incapaz de producir partículas maduras cuando las células a las que infecta, son células de mamífero. Lo anterior es debido a que la cepa MVA presenta 6 deleciones mayores en su DNA, como consecuencia de los numerosos pasajes sufridos en CEF. Estas 6 deleciones

hacen un total de 31,000 pares de bases y afectan, al menos, dos genes de rango de huésped. Esta cepa sólo es capaz de producir partículas infectivas en fibroblastos de embrión de pollo (1, 49, 90).

Otras características que hacen de la cepa MVA un candidato ideal para la construcción de vectores de expresión y vacunas recombinantes son:

- Los virus recombinantes contruidos con esta cepa son capaces de sintetizar grandes cantidades de la proteína codificada por el gen clonado.**
- La cepa MVA ha probado ser totalmente avirulenta, incluso cuando se utilizó en animales inmunodeficientes (atímicos).**
- Existe una experiencia clínica en Alemania, en donde se utilizó la cepa MVA para vacunar contra la viruela a más de 120,000 humanos. La cepa protegió adecuadamente contra tal enfermedad, no observándose ningún efecto secundario.**
- Hay experimentos que demuestran que, contrariamente a lo esperado, la cepa MVA puede expresar tanto genes tempranos, como intermedios y tardíos (90).**

En algunas partes del mundo ya se ha comenzado a utilizar la cepa MVA para la construcción de vacunas recombinantes, a nivel experimental. La Tabla No. 3 muestra cuales son estas vacunas.

TABLA No. 3.
CEPA ATENUADA DEL VIRUS DE LA VACCINIA (MVA), COMO VECTOR
DE ANTIGENOS PARA LA FABRICACION DE VACUNAS

| Enfermedad: | Virus causante: | Ag que expresa la vacuna recombinante: |
|------------------------------|---|--|
| Influenza | Virus de influenza tipo A | Hemaglutinina. Nucleoproteína. |
| Inmunodeficiencia del simio. | Virus de la inmunodeficiencia del simio. (SIV). | Proteína del core. |
| Adenocarcinoma. | No se conoce. | IL-2 IL-6 |
| Cáncer cervico-uterino. | Papilomavirus humano. (HPV) | E2 |

II. OBJETIVOS E HIPOTESIS :

OBJETIVOS :

- 1. Construir una cepa recombinante con virus de la vacuna (utilizando para ello, la cepa atenuada del virus: MVA), que exprese eficazmente el gen E2 de papilomavirus.**
- 2. Emplear la cepa construida para reducir el crecimiento de tumores cérvico-anales en humanos.**

HIPOTESIS :

Al tratar tumores cérvico-anales inducidos por los oncogenes E6 y E7 del papilomavirus humano (HPV) con la cepa recombinante MVA que expresa el gen E2, habrá una disminución en el crecimiento de dichos tumores.

III. JUSTIFICACION :

Actualmente el cáncer cérvico-uterino constituye a nivel mundial, la segunda causa de muerte por neoplasias entre la población femenina, superado sólo por el cáncer de mama; sin embargo la incidencia de esta enfermedad difiere entre los países desarrollados y los subdesarrollados (siendo de 4 a 8 veces mayor en éstos últimos). En México, por ejemplo, el cáncer de cérvix representa el 31% de los cánceres que afectan a las mujeres, ocupando el primer lugar en frecuencia y mortalidad.

En más del 90% de los tumores de cuello uterino se han encontrado secuencias del DNA de algún tipo de virus de papiloma humano (HPV), particularmente de los tipos 16, 18, 31 y 33, lo cual indica que estos virus son los principales agentes etiológicos de esta enfermedad neoplásica.

Dentro de los HPV, se han identificado dos oncogenes denominados E6 y E7, que son los responsables de la transformación de las células humanas que los portan.

Una expresión continua de estos oncogenes, se traduce en la inmortalización de las células de un gran porcentaje de tumores cérvico-anales.

El genoma de los HPV contiene también el gen E2 cuyo producto, la proteína E2, reprime la expresión de los oncogenes E6 y E7. Sucede que en la mayoría de los tumores cérvico-anales, las secuencias virales están integradas en el genoma celular y normalmente esta integración conduce a la pérdida de la región viral que incluye a los genes E1 y E2, es decir, la integración elimina el control negativo que ejerce E2 sobre la expresión continua de dichos oncogenes ocasionando la formación y propagación del tumor (30).

Por otra parte, el virus de la vaccinia (que se ha utilizado desde hace más de 100 años para vacunar contra la viruela), es usado actualmente en la construcción de vectores y cepas recombinantes que expresan diversos genes, los cuales son usados para la inmunización (producción de vacunas) y tratamiento de algunas enfermedades en humanos (90).

De las cepas de vaccinia existentes, la cepa atenuada MVA es la única que se ha probado en inmunizaciones en humanos (viruela). Es por ello que en este proyecto de investigación se utiliza la cepa MVA para la construcción de una cepa recombinante del virus de la vaccinia que contiene el gen E2 de papilomavirus, y se emplea la misma pa-

ra disminuir el crecimiento de tumores cérvico-anales en humanos.

IV. REACTIVOS Y MEDIOS :

A. REACTIVOS:

- El grado de los reactivos empleados fue analítico (de no ser así, se especifica), y se obtuvieron de las casas comerciales Merck, J. T. Baker, Sigma, Worthington Biochemical Corporation, Boehringer Mannheim, Promega, Stratagene, Biolabs, BRL.

- Las enzimas requeridas fueron:

Casa comercial:

1. Boehringer Mannheim

* AMV Transcriptasa reversa.

* DNA polimerasa I.

* RNAsa.

* Ligasa.

* Cinasa.

* Fosfatasa alcalina.

2. Sigma:

* Lisozima.

3. Biolabs:

* BamH I.

* ABC I.

4. BRL:

*** Tripelina (Para células en cultivo).**

- Preparación:

. 150 mM NaCl.

. 0.02% EDTA.

. 0.25% Tripelina (BRL).

La solución se esteriliza empleando un filtro con tamaño de poro de 0.42µm.

5. Worthington Biochemical Corporation:

*** Tripelina (Para virus).**

La pureza de esta enzima es del 84%. Se prepara disolviéndola en agua a una concentración de: 2.5 mg/ml. Se esteriliza por filtración en filtros con tamaño de poro de 0.42µm.

B. MEDIOS:

1. Medio Luria:

| | |
|-------------------------------|--------------------|
| - Triptona | 10g |
| - NaCl | 10g |
| - Extracto de levadura | 5g |
| - Agua | cbp 1000 ml |

Este medio se esteriliza en autoclave a 120 lb/plg² durante 15 minutos.

2. Medio esencial mínimo Dulbecco (D-MEM):

La mezcla de ingredientes que constituye el medio D-MEM en polvo, se adquiere de la casa comercial Gibco BRL en botes que contienen la cantidad necesaria (99.8 g) para la preparación de 10 litros de medio.

Los componentes del medio son:

- * L-glutamina.
- * L-metionina.
- * L-leucina.
- * L-cisteína.
- * Piruvato de sodio.
- * Cloruro de calcio.
- * Fosfato de sodio.
- * Inositol.
- * Rojo de fenol.

El medio cuenta además, con un bajo contenido de glucosa (1,000 mg/L D-glucosa).

La preparación del medio se realiza disolviendo en 10 litros de agua, 37g de bicarbonato de sodio y un bote completo de medio D-MEM en polvo. El pH se ajusta a 7.0, para lo cual se burbujea CO₂ dentro del matraz que contiene el

medio hasta que se alcanza dicho pH.

El medio se esteriliza mediante filtración por presión con N₂, utilizando un prefiltro con tamaño de poro de 0.45 μm y un filtro cuyo tamaño de poro es de 0.22 μm. Una vez preparado el medio, éste se almacena a 4°C.

V. MATERIALES:

A. PACIENTE:

La paciente fue una mujer infectada con el virus de papiloma humano tipo 18, que presentaba tumoraciones en cérvix y vagina. Dicha paciente fue contactada gracias a la colaboración del Dr. Abelardo Monge del Hospital Mocoel.

B. CELULAS, VIRUS Y CEPAS:

A continuación se describen las diferentes líneas celulares empleadas:

- Células HeLa: Son células derivadas de carcinoma de cérvix humano, que tienen integrado a su genoma, el genoma del virus de papiloma humano tipo 18 (HPV-18) el cual se transcribe activamente en estas células; (ATCC).
- Células BS-C-1: Células de riñón de mono verde africano de la especie *Cercopithecus aethiops*. Su morfología es parecida a la epitelial; (ATCC).
- Células 3T3-F4: Células de embrión de ratón de la especie *Mus musculus* que contienen integrado en su genoma el gen de β -galactosidasa bajo el control de la región LCR del papilomavirus humano. Estas células fueron gen-

tilmente proporcionadas por el Dr. Alejandro García Carrancá del departamento de Biología Molecular (Instituto de Investigaciones Biomédicas).

Las tres líneas celulares antes mencionadas, fueron crecidas en medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C, con atmósfera de CO₂ del 5% y una humedad del 85%.

También se requirió la utilización de fibroblastos de embrión de pollo (a los que me referiré en ocasiones como CEF por sus siglas en inglés), los cuales fueron preparados en el laboratorio según la metodología descrita en METODOS.

La cepa viral empleada, fue la cepa MVA (Modified Vaccinia Ankara) amablemente proporcionada por el Dr. Gerd Sutter (Institute of Molecular Virology, GSF Center of Environmental and Health Research, Neuherberg, Alemania).

Se utilizó también la cepa bacteriana de *E. coli* XL1-Blue, que tiene el fenotipo r^+ Rec⁻ y el genotipo Sup E⁺ lac-hsdR17 recA1 F[']proAB⁺ lacI^q lacZΔM15.

C. EQUIPO EMPLEADO:

a) Espectrofotómetro Beckman, modelo DU-55.

- b) Microcentrifuga eppendorf, modelo 5415 C.**
- c) Baño de agua Lauda, modelo M20.**
- d) Potenciómetro Beckman, modelo Ø75.**
- e) Sonificador Cole-Parmer, modelo 4710.**
- f) Centrifuga Beckman, modelo J2-MC.**
- g) Ultracentrifuga Beckman, modelo XL-90.**
- h) Centrifuga Sorvall, modelo RT 6000D.**
- i) Speed Vac Savant, modelo SC110.**
- j) Termociclador Perkin Elmer, modelo 9600.**
- k) Incubadora con agitador, New Brunswick Scientific.**

VI. METODOS :

RESUMEN :

La metodología empleada para la realización de este proyecto puede dividirse en 3 etapas principales, a saber:

a) Construcción de la cepa recombinante MVA-E2: En esta etapa los primeros pasos a seguir fueron la preparación del gen E2 de papilomavirus por medio de la técnica de amplificación de DNA (PCR) y su clonación en el vector llamado pIII gtp dspA (Figura D).

Este plásmido contiene 2 regiones no esenciales del genoma del virus MVA (conocidas como flanco 1 y flanco 2), en medio de las cuales se clonó el gen E2 dando como resultado un plásmido recombinante (pIII gtp dspA-E2).

Este plásmido recombinante fue transfectado en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), que posteriormente fueron infectados con el virus MVA.

En el interior de la célula se lleva a cabo una recombinación homóloga entre el plásmido recombinante y el DNA viral, que da como resultado la obtención de una cepa viral recombinante que contiene integrado el gen E2 del virus

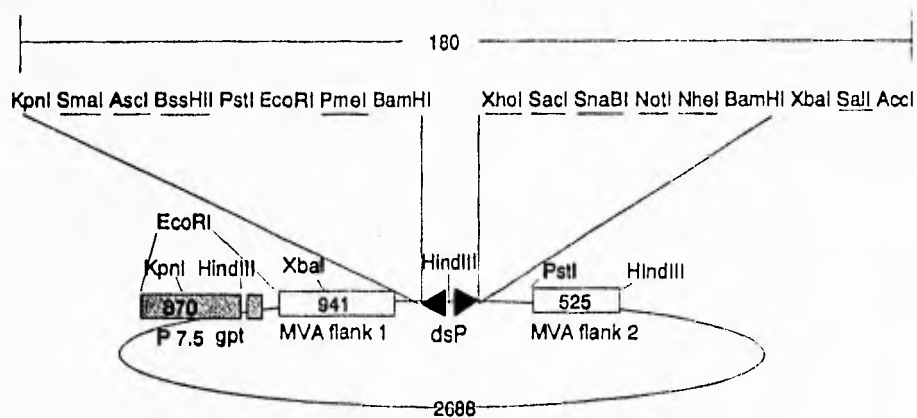


FIGURA D: Vector de expresión (pIII gpt dspA) del virus MVA. Se observan los flancos 1 y 2 en medio de los cuales, fue clonado el gen E2 del virus de papiloma humano. Los números indican el tamaño del sitio en cuestión (en pares de bases).

de papiloma (el sitio de inserción del gen E2 queda determinado por los flancos 1 y 2 del MVA).

Debido a que el número de virus recombinantes deseados, comprende sólo un pequeño porcentaje de la progenie viral, fue necesario emplear un método de selección que consistió en el aislamiento de dichos recombinantes mediante rondas de purificación de placas virales con ácido micofenólico, xantina e hipoxantina, como drogas de selección.

Finalmente, se verificó la integración del gen E2 en dos de las recombinantes seleccionadas.

b) Determinación de la expresión del gen E2 de la cepa recombinante MVA-E2 construida: Para este fin se llevaron a cabo varios experimentos; en el primero de ellos, se crecieron e infectaron células HeLa (ver características en CELULAS, VIRUS Y CEPAS), tanto con la cepa MVA, como con la cepa recombinante MVA-E2. Estas células fueron recolectadas 24h después de la infección.

De las células recolectadas, se aisló el RNA total y empleando 3µg de cada uno de ellos, se sintetizaron los DNAs complementarios (cDNAs), utilizando la enzima transcriptasa reversa.

Los cDNAs obtenidos fueron purificados y resuspendidos en agua y una parte de éstos fue amplificada mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos complementarios para el gen E2.

En otro de los experimentos, se determinó que la proteína E2, reduce la actividad transcripcional de los elementos de control de los virus de papiloma humano (HPV), involucradas en el desarrollo de tumores de la región genital.

Esto se realizó infectando células 3T3-F4 (ver características en CELULAS, VIRUS Y CEPAS), con las cepas virales MVA y MVA-E2, recolectar las células 24h después de la infección, aislar el RNA total, a partir del cual, empleando 3 µg de cada uno, se sintetizó el DNA complementario o cDNA.

Los cDNAs sintetizados se purificaron, se resuspendieron en agua y posteriormente se amplificaron por PCR con oligonucleótidos específicos para el gen de β-galactosidasa.

Para analizar la estabilidad del mRNA de E2, se realizó un experimento en el que células BS-C-1 (ver características en CELULAS, VIRUS Y CEPAS), se infectaron con la cepa recombinante MVA-E2. En esta ocasión, la recolección de las células se realizó a 3 diferentes tiempos (2, 3 y 4 días

después de la infección respectivamente). De cada uno de los puntos recolectados, se aisló el RNA total, y como en los experimentos anteriores, se emplearon 3 µg de RNA total para llevar a cabo la síntesis de los cDNAs (mediante la enzima transcriptasa reversa); posteriormente se realizó la purificación de dichos cDNAs y la consecuente amplificación de los cDNAs con oligonucleótidos específicos y complementarios para el gen E2.

El experimento final de esta etapa, se llevó a cabo con el fin de detectar la presencia de la proteína E2 en células infectadas con la cepa recombinante.

Para ello, se infectaron células BS-C-1 con las cepas MVA y MVA-E2; 24h después de la infección se adicionó [³⁵S]-Metionina, misma que fue utilizada por las células para la síntesis de proteínas *de novo* (entre las cuales se encontraba E2). La recolección celular se realizó media, una y dos horas después, de que la metionina radiactiva fue adicionada; estas células se lizaron y el lisado fue sometido a un ensayo de radioinmunoprecipitación, empleando proteína A Separosa y anticuerpo dirigido contra la proteína E2 del virus de papiloma bovino. El producto de este ensayo se analizó en un gel de poliacrilamida al 12% seguido de autorradiografía.

c) Evaluación del efecto de la expresión del gen E2 de la cepa recombinante, sobre el crecimiento de tumores de la región genital en humanos: El primer paso en esta última etapa del proyecto consistió en obtener una biopsia de un tumor genital y aislar el DNA. El DNA de la biopsia junto con DNA obtenido de diferentes tipos de HPV, fueron sometidos a la técnica de PCR empleando oligonucleótidos específicos para la amplificación de la región L1 (la cual es una región altamente conservada del genoma de los diversos tipos de HPV); los productos del PCR fueron analizados mediante un gel de poliacrilamida observándose que el tumor era ocasionado por HPV tipo 18 (Ver RESULTADOS).

El siguiente paso fue inyectar directo en el tumor, con la cepa recombinante MVA-E2, en diversos sitios y repetidas ocasiones y finalmente observar si existía o no disminución en el crecimiento del tumor.

A. PRIMERA ETAPA :

CONSTRUCCION DE LA CEPA RECOMBINANTE MVA-E2.

1. Amplificación mediante PCR del gen E2 del virus de papiloma bovino (BPV). (54)

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa, mejor conocida como PCR, es una técnica tan sensible que nos permite amplificar una simple molécula de DNA y después visualizarla como una banda en un gel de agarosa.

La amplificación de 1 µg del plásmido C59, que tiene insertado el gen E2 del BPV (proporcionado por el Dr. Peter M. Howley, Laboratory of Pathology, National Cancer Institute, Bethesda) se lleva a cabo en una mezcla de reacción de 100 µl que contiene: 10 mM Tris-HCL (pH 8.8); 50 mM KCL; 1.5 mM MgCL₂; 0.001% (p/v) gelatina; 2.5 mM de cada uno de los 4 desoxirribonucleótidos, 1 µg de cada oligonucleótido (GS78: 5'-CAGCAGGGATCCAGGATGGAGACAGCATGCGAACGT - 3' y GS79: 5'-CAGCAGGCGCGCCCATCATTGGTGGTGCCTTGGG - 3') y una unidad de Taq DNA polimerasa.

Los componentes se mezclaron con suma delicadeza para no desnaturalizar la enzima y se incubaron durante 40 ciclos en un termociclador Perkin-Elmer, modelo 9600.

Cada ciclo consistió de un paso de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, seguido de un paso de alineamiento a 45°C

por 2 minutos y un último paso, de elongación de la cadena a 72°C por 2 minutos.

Una alícuota del producto del PCR (10 µl), se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA).

2. Transformación de la bacteria *E. coli* XL1-Blue para la preparación del plásmido pIII gpt dspA (47).

Se prepara un precultivo poniendo en un tubo falcon de 15 ml, 5 ml de medio Luria más 20 μ l de la bacteria *E. coli* XL1-Blue. El tubo se incuba a 37°C con agitación, toda una noche.

Al día siguiente se colocan 50 ml de medio Luria más 1 ml del precultivo de la bacteria XL1-Blue en un matraz de 500 ml, el cual se pone a incubar a 37°C con agitación, hasta alcanzar una absorbancia de 0.3 medida a 600nm.

Alcanzada dicha densidad, las bacterias se centrifugan a 5000 rpm durante 3 minutos, a 4°C, en rotor JA-14 (Beckman, modelo J2-MC). Se descarta el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspende en 5ml de NaCl 150 mM.

La suspensión bacteriana se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones que se indicaron anteriormente.

El sobrenadante se elimina y el botón se resuspende en 5 ml de CaCl₂ 0.1 M; esta nueva suspensión se coloca en hielo durante 20 minutos y después se centrifuga a 5,000 rpm por diez minutos, a 4°C y en rotor JA-14 (Beckman, modelo J2-MC).

Se descarta el sobrenadante y el botón se resuspende en 2ml de CaCl_2 0.1 M. Se toman 200 μl de esta suspensión y se colocan en un tubo eppendorf; adicionar 100ng del plásmido pIII gpt dsp A.

El tubo se deja en hielo 1h; posteriormente, la bacteria se somete a un choque térmico poniendo el tubo 70 segundos a 42°C; inmediatamente se coloca en hielo.

Los 200 μl del transformado, se diluyen en 2 ml de medio Luria; se incuba a 37°C durante 15 minutos y después se coloca en una caja Petri que contiene agar con ampicilina (concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La caja se incuba a 37°C durante 18h para permitir el crecimiento de colonias transformantes.

De las colonias formadas, se toman 2 ó 3 y se siembran en medio Luria más ampicilina (a una concentración de 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$), para el posterior aislamiento de DNA (Ver "Aislamiento del pláemido pIII gpt dsp A mediante maxipreparación").

3. Aislamiento del plásmido pIII gpt dspA mediante maxipreparación. (47)

Se crecen 5 ml de un inóculo de la bacteria *E. coli* XL1-Blue transformada toda la noche con el plásmido pIII gpt dspA. Posteriormente, estos 5 ml se adicionan en 1 litro de medio Luria más ampicilina (100 µg/ml), con agitación, a 37°C, durante toda una noche.

Al día siguiente, el cultivo se centrifuga por 15 minutos a 5,000 rpm, en rotor JA-14 (Beckman J2-MC) y a una temperatura de 4°C. Se descarta el sobrenadante y la pastilla bacteriana se resuspende en 10 ml de la solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, lisozima 5 mg/ml); se deja a temperatura ambiente 5 minutos y se agregan 20 ml de la solución II recién preparada (0.2N NaOH; 1% SDS), se mezcla suavemente y se deja en hielo 5 minutos; se adicionan 15 ml de la solución III (5M acetato; 3M potasio) y se deja en hielo 5 minutos.

Se centrifuga durante 20 minutos a 5,000 rpm, a 4°C en rotor JA-14 (Beckman J2-MC). Se toma el sobrenadante y se le agrega 0.5 volúmenes de isopropanol.

Se incuba aproximadamente 15 minutos, a temperatura ambiente y se centrifuga durante 5 minutos a 5,000 rpm en

las condiciones anteriormente mencionadas.

Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla obtenida en 2 ml de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA). Realizar una extracción fenol-cloroformo y una extracción fenólica, adicionando volúmenes de fenol de 200 μ l y de cloroformo de 300 μ l.

Purificar el plásmido por medio de un gradiente de cloruro de cesio con bromuro de etidio (Ver "Gradiente de cloruro de cesio para purificación del plásmido pIII gpt dep A").

4. Gradiente de cloruro de cesio para purificación del plásmido pIII gpt dspA (47).

El DNA obtenido por la técnica de maxipreparación, se re-suspende en 200 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (H₂O-DPC) a los que se le agregan 3.8 ml de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA); se añade 1g de CaCl sólido (J.T. Baker, ultrapuro), por cada mililitro de solución de DNA, además de 300 μ l de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml, en agua).

Agitar utilizando vortex y colocar la solución en tubos de rotor NTV 90 (Beckman XL-90). Dichos tubos se equilibran, se sellan y se colocan en el rotor (al colocar los tornillos en el rotor, éstos deben apretarse hasta alcanzar una presión de 120 lb/plg²). El gradiente se forma centrifugando a 85,000 rpm, 20°C y un periodo de 3h.

La banda que contiene el plásmido se colecta como a continuación se describe:

Se inserta una aguja hipodérmica con el bisel hacia arriba en la parte superior del tubo que contiene el gradiente para permitir la entrada de aire.

Posteriormente, una segunda aguja hipodérmica (con el bi-

señal hacia arriba) debe insertarse justo debajo y paralela, a la banda que contiene el plásmido, la cual se colecta succionando con una jeringa y se transfiere a un tubo falcon de 15 ml; para eliminar el bromuro de etidio, se realiza una extracción con 1-butanol, agregando a la solución de DNA, un volumen igual de este solvente orgánico y agitando con la ayuda de vórtex; eliminar la fase superior teniendo cuidado de no tocar la interfase. Añadir 2 ml de 1-butanol y repetir el procedimiento anterior. La extracción se repite hasta que el color rosa ha desaparecido tanto de la fase acuosa como de la fase orgánica.

El CaCl se elimina de la solución de DNA mediante diálisis en solución amortiguadora TE a temperatura ambiente por 1h.

5. Preparación del plásmido pIII gpt dspA-E2. (47)

10 μg del plásmido pIII gpt dspA, se digirieron en una mezcla de reacción de 20 μl conteniendo: 10 unidades de la enzima de restricción BamH-I y solución amortiguadora universal 1X (1M KOAc; 250 mM Tris-Acetato, pH 7.6; 100 mM MgOAc; 5mM β -mercaptoetanol; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA), durante 2 h, a 37°C.

Al terminar la digestión, ésta se limpió mediante una extracción fenol-cloroformo, utilizando 200 μl de fenol y 300 μl de cloroformo. Posteriormente, el plásmido se resuspende en 10 μl de agua tratada con dietilpirocarbonato (H₂O-DPC). Después se preparan 20 μl de una nueva mezcla de digestión que contenga: 10 unidades de la enzima de restricción ASC-1, 50 mM de acetato de potasio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 1 mM dilitotritol; se digiere por 2 h, a 37°C. El plásmido se limpia como se describió anteriormente y el DNA se resuspende en 10 μl de H₂O-DPC.

El plásmido digerido se desfosforila utilizando 2 unidades de la enzima fosfatasa alcalina, por μg de plásmido, se incuba por 30 minutos a 37°C (el lapso de incubación con le

enzima no debe ser nunca mayor de 40 minutos). Purificar el plásmido desfosforilado, mediante una nueva extracción fenol-cloroformo.

Se prepara una última mezcla de reacción de 20 μ l que contenga el gen E2 del virus de papiloma (amplificado mediante PCR, ver página 58), más el plásmido pIII gpt dspA digerido y desfosforilado (en una relación gen-plásmido de 10:1), 5 unidades de la enzima DNA ligasa, 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM ditiotretol, 28 μ M NAD⁺, y 25 μ g/ml albúmina de suero de bovino. La reacción se incuba a 16°C durante toda una noche; al día siguiente, se inactiva la enzima calentando a 65°C por 10 minutos y se limpia la ligación por medio de una extracción fenol-cloroformo.

6. Preparación y purificación de stock del virus MVA (54).

10 cajas P150 que contienen CEF al 100% de confluencia celular, se infectan con 0.1 PFU (Unidades Formadoras de Placa) de virus MVA por célula; 48 h después de la infección, se colectan las células y se transfieren a tubos falcon de 50 ml, los cuales se centrifugan a 2500 rpm, a 20°C y en rotor H1000B (Sorvall), durante 5 minutos.

El sobrenadante se elimina por succión y el botón celular de uno de los tubos, se resuspende en 10 ml de Tris-HCl pH 9.0 (10 mM). El resto de los botones se resuspende en esta suspensión (a partir de este punto, el resto de los pasos debe realizarse en hielo).

La suspensión celular es transferida a un homogenizador de vidrio en el cual, mediante 30 ó 40 golpes, se rompen las células. Para eliminar los núcleos, el homogenizado se centrifuga durante 5 minutos a 3000 rpm, 20°C y en rotor H1000B (Sorvall). Conservar el sobrenadante.

El botón se resuspende en 3ml de Tris-HCl pH 9.0 (10mM), se centrifuga nuevamente (en las mismas condiciones arriba mencionadas). Reunir los sobrenadantes en un tubo falcon donde se sonicarán dando 4 golpes de 15 segundos, con intervalos de 45 segundos, a 20 micrones (sonica-

dor Cole-Palmer, 4710). Para obtener mejores resultados, pueden prepararse alícuotas de 3 ml de lisado y sonicar cada una de ellas por separado.

Colocar en un tubo SW27, 17 ml de sacarosa al 36% y sobre éstos, el sonicado. Centrifugar durante 80 minutos a 4°C y 13,000 rpm en rotor SW 28.1 (Beckman).

Descartar el sobrenadante mediante aspiración; el botón de virus se resuspende en 2 ml de Tris-HCl, 1 mM pH 9.0. Sonicar nuevamente en las condiciones antes mencionadas.

Por otra parte se prepara en condiciones de estricta esterilidad, un gradiente continuo de sacarosa tal como se indica a continuación: un día antes de su utilización, se lavan 2 tubos SW27 con NaOH 0.5 N y abundante agua bidestilada; cuando se han eliminado por completo los residuos de NaOH de los tubos, se les adiciona a cada uno y siempre una sobre otra 6.8 ml de cada una de las soluciones de sacarosa de las siguientes concentraciones: 40%, 36%, 32%, 28% y 24%. El gradiente se deja en el refrigerador por toda una noche.

Sobre cada uno de los tubos que contienen el gradiente, se estratifica 1 ml del virus resuspendido en Tris-HCl 1 mM

(pH 9.0), se centrifuga durante 50 minutos a 12,000 rpm, 4°C en rotor SW 28.1 (Beckman).

Después de centrifugar, el virus se observa como una banda lechosa aproximadamente a la mitad del tubo; mediante succión se elimina la sacarosa que se encuentra sobre la banda. El virus se colecta con una pipeta estéril y se coloca en un tubo SW27 nuevo. En caso de que se presente un botón de virus agregado en el fondo de los gradientes, se retira el resto de la sacarosa de los tubos y los botones se resuspenden en 1ml de Tris-HCL 1mM (pH 9.0); se sonica y nuevamente, se estratifica el sonicado sobre otro gradiente continuo de sacarosa; se repite el proceso.

Al tubo SW 27 que contiene el virus recolectado de los gradientes, se le adiciona la cantidad de Tris-HCl 1mM (pH 9.0) necesaria para llenarlo; se centrifuga a 13,500 rpm por 1 h, a 4°C en rotor SW 28.1 (Beckman), con el fin de empastillar el virus.

Al terminar la centrifugación, se descarta el sobrenadante y el botón viral se resuspende en 1 ml de Tris-HCl 1 mM (pH 9.0). Finalmente, esta suspensión se allicuota y se almacena a -70°C.

La cantidad aproximada de virus puede determinarse es-

pectrofotométricamente a 260 nm, tomando en cuenta que una unidad de absorbancia corresponde aproximadamente a 1.2×10^{10} partículas virales (prácticamente 2.5 a 5×10^9 PFU). Para titular, el stock se sonica de 20 a 30 segundos en hielo y se preparan (por duplicado) diluciones seriadas del mismo, con las que se infectan CEF colocados en cajas de 6 pozos (de 35mm de diámetro).

pectrofotométricamente a 260 nm, tomando en cuenta que una unidad de absorbancia corresponde aproximadamente a 1.2×10^{10} partículas virales (prácticamente 2.5 a 5×10^8 PFU). Para titular, el stock se sonica de 20 a 30 segundos en hielo y se preparan (por duplicado) diluciones seriadas del mismo, con las que se infectan CEF colocados en cajas de 6 pozos (de 35mm de diámetro).

7. Preparación de fibroblastos de embrión de pollo (CEF)

(Comunicación personal; Dr. Gerd Sutter).

1) Materiales:

- 2 vasos de precipitado cubiertos con gasa.
- 2 jeringas de 20ml.
- 2 tubos falcon de 50ml.
- 3 cajas Petri de 9cm de diámetro.
- Tijeras y pinzas de disección.
- Medio D-MEM, antibióticos y suero fetal de bovino.
- 10 huevos embrionados de 12 días de edad (la edad debe ser correcta, pues embriones de 11 días son demasiado pequeños y de 13 días pueden estar emplumados).

NOTA: Todo el material empleado debe estar estéril.

2) Preparación:

- Colocar los huevos en la campana con la cámara de aire hacia arriba y rociarlos con etanol.
- Romper la parte superior del cascarón con las tijeras; cortar el cascarón al ras de la membrana.
- Cortar la membrana por la orilla y quitarla.
- Sacar al embrión con las pinzas y colocarlo en una caja Petri que contenga medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (D-MEM al 10% SFB) y antibióticos

(Estreptomycin y ampicilina; 240 µg/ml).

- Quitar la cabeza, patas y alas y pasar lo que resta del embrión a otra caja Petri con medio D-MEM al 10% SFB fresco para lavar.
- Quitar los órganos internos con ayuda de las pinzas y transferir al embrión a otra caja Petri con medio D-MEM al 10% SFB, para un último lavado.
- Se colocan los embriones en una jeringa de 20ml y se hacen pasar a través de ella, colocando el contenido en otra jeringa de 20ml para repetir la operación. En esta ocasión, el contenido de la jeringa se coloca en un tubo falcon de 50ml.
- Adicionar un volumen de tripsina y agitar vigorosamente; incubar con agitación a 37°C, durante 5 minutos.
- Pasar el contenido del tubo a través de una gasa (el fluido debe caer dentro del vaso de precipitado estéril). Una vez recolectado todo el fluido, éste se transfiere a un tubo falcon nuevo.
- Adicionar tripsina fresca y mezclar vigorosamente; incubar con agitación, 5 minutos a 37°C.
- Pasar nuevamente el contenido del tubo falcon a través de una gasa; recolectar en un vaso de precipitado estéril para después transferir el fluido a otro tubo falcon de 50 ml.

- Centrifugar a 2500 rpm, durante 5 minutos a temperatura ambiente en rotor H1000B (Sorvall).
- Eliminar la tripsina mediante succión y agregar 10ml de medio D-MEM al 10% SFB más antibióticos y resuspender el botón celular.
- Centrifugar a 2500 rpm por otros 5 minutos.
- Retirar el medio y adicionar 10 ml de medio D-MEM al 10% SFB, en los cuales se resuspende la pastilla celular.
- A 10 cajas de cultivo P75 (Costar) a las que previamente se les ha adicionado 14 ml de medio D-MEM al 10% SFB, se les agrega 1ml de la suspensión celular preparada en el paso anterior; se mezclan y se incuban a 37°C, en atmósfera de CO₂ y humedad del 85% durante varios días para permitir el desarrollo celular.
- El desecho de los huevos se coloca dentro de una bolsa de plástico y se incinera a la brevedad posible.

8. Construcción de la cepa MVA-E2. (64)

La construcción de esta cepa recombinante, se realizó mediante la infección de CEF con el virus MVA y su posterior transfección con el plásmido pIII gpt dspA-E2; el proceso de construcción es el siguiente:

Dos cajas de Petri de 10 cm de diámetro que contienen CEF y que han alcanzado la confluencia, se infectan con 0.05 PFU de virus MVA por célula (el virus debe sonicarse y tripsinizarse previamente). Incubar a 37°C durante 2 h agitando las cajas a intervalos de 15 minutos. 30 minutos antes de que finalice el período de infección, el plásmido recombinante se precipita en una solución de fosfato de calcio tal como se indica a continuación:

En un tubo de poliestireno de 12 x 75 mm, se colocan 1 ml de solución amortiguadora de transfección, pH 7.0 (0.14 M NaCl; 5 mM KCl; 1 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O; 0.1 % dextrosa; 20 mM HEPES) y 20 µg del plásmido pIII gpt dsp A-E2; se mezcla en vortex vigorosamente y muy despacio se adicionan 50 µl de CaCl₂ (2.5 M). Se agita suavemente y se deja el tubo a temperatura ambiente durante 20 ó 30 minutos, hasta observar la aparición de un precipitado fino (preparar un tubo por caja).

Quando el tiempo de infección ha finalizado, se aspira el inóculo de virus de las cajas de Petri y se añade la solución del precipitado dejando las cajas a temperatura ambiente por 30 minutos; después, se agregan 9 ml de medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino. Se incuban las cajas por 3 ó 4 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, con humedad del 85%.

Se aspira el medio y se reemplaza con 5 ml de medio D-MEM al 10% fresco. Se incuba nuevamente en las mismas condiciones, durante 2 días. Se recolectan las células y se transfieren a un tubo falcon de 15 ml; empastillar los fibroblastos mediante una breve centrifugación (2 minutos a 2,500 rpm, a temperatura ambiente y en rotor H1000B Sorvall) y descartar el sobrenadante; resuspender el botón celular en 0.5 ml de medio D-MEM al 10 % SFB.

Lisar las células mediante tres ciclos de congelación-descongelación (utilizando hielo seco/etanol, seguido de descongelación en baño de agua a 37°C).

Selección de recombinantes:

100 µl de células lisadas conteniendo virus, se sonicán de 20 a 30 segundos y con éstos se preparan, por duplicado, diluciones seriadas del mismo (en medio D-MEM al 2.5%

SFB más 1/400 volúmenes de ácido micofenólico (MPA), 1/40 volúmenes de xantina y 1/400 volúmenes de hipoxantina).

Empleando 0.5 ml de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} se infectan CEF colocados en cajas de seis pozos de 35 mm de diámetro; se incuban a 37°C en atmósfera de CO₂ del 5% y humedad del 85%, durante 2 h (agitando a intervalos de 15 minutos).

La infección se detiene adicionando 1.5 ml de medio D-MEM al 10% SFB y las cajas se vuelven a incubar en las mismas condiciones, por un par de días, al cabo de los cuales se observan las cajas al microscopio en busca de placas virales.

Las placas virales localizadas, se colectan con ayuda de una micropipeta y se diluyen en 500 µl de medio D-MEM al 2.5 % SFB (más las drogas de selección en las mismas cantidades arriba descritas), a partir de las cuales se prepararán nuevamente diluciones seriadas para repetir el proceso de purificación de placas virales. Esto se realiza aproximadamente 6 veces, para asegurar la pureza de los virus recombinantes.

Los stocks de las drogas de selección se preparan como a

continuación se indica:

Disolver ácido micofenólico (MPA) a una concentración de 10 mg/ml (400X) en NaOH 0.1 N y almacenar a -20°C, protegiéndolo de la luz.

La xantina se disuelve también en NaOH 0.1N, a una concentración de 10 mg/ml (40X); se guarda a -20°C.

La hipoxantina, se disuelve en agua, a una concentración de 6 mg/ml (400X) y se almacena a -20°C.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9. Análisis de la Integración del gen E2 en las recombinantes E2-4 y E2-11.

(Comunicación personal: Dr. Ricardo Rosales).

A 1 ml del stock de virus de cada una de las recombinantes denominadas E2-4 y E2-11, se les adicionó 1 ml de solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA), 100 µg de proteinasa K; esta mezcla se incubó a 37°C por 24 h. Al terminar la incubación, el DNA se purificó mediante una extracción fenol-cloroformo (utilizando 200 y 300 µl de cada uno respectivamente) y una extracción más con 300 µl de cloroformo.

A la fase acuosa de esta última extracción, se le añade NaCl a una concentración final de 0.25 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto; se mezcla en vortex y se deja precipitando el DNA durante toda la noche a -20°C.

Al día siguiente se centrifuga, se elimina el sobrenadante y el botón de DNA, se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril, a una concentración de 1 µg/µl.

1 µg de este DNA se amplifica mediante la técnica de PCR, en una mezcla de reacción cuyo contenido es:

2.5 mM de los 4 desoxirribonucleótidos, 10 mM Tris-HCl

(pH 8.8), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001 % (p/v) gelatina, 1 µg de cada oligonucleótido (GS82: 5'-GGTTGTTGATGGA TCTGTGATGCATGCGATAGCTGA -3' y GS83: 5'-GAATGCA CATAATAAGTACCGGCATCTCTAGCAGT -3') y una unidad de Taq DNA polimerasa.

Usando un termociclador Perkin-Elmer 9600, se realizan 30 ciclos de amplificación, cuyas condiciones son: un primer paso, de desnaturalización, a 94°C por 1 minuto, un segundo paso (de alineación), a 45 grados, por 2 minutos y el tercero (de elongación), a 72°C, 2 minutos.

El producto del PCR se digiere con 10 unidades de las enzimas de restricción BamH-I y ASC-I, por 2h a 37°C; posteriormente se realiza la purificación de esta digestión por medio de una extracción fenol-cloroformo (con volúmenes de 200 y 300 µl respectivamente). El DNA se resuspende en H₂O-DPC y se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, en solución amortiguadora TAE (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA).

B. SEGUNDA ETAPA :

**DETERMINACION DE LA EXPRESION DEL GEN E2
DE LA CEPA MVA-E2.**

1. Descongelamiento de células. (23)

Las ampollitas de vidrio conteniendo células provenientes de la compañía ATCC, se mantienen en nitrógeno líquido. Para descongelarlas se colocan en baño de agua a 37°C el lapso de tiempo necesario para el total descongelamiento de las células (un minuto aproximadamente).

Posteriormente se vierte en una caja de cultivo P25 a la cual previamente se le agregan 4 ml de medio D-MEM al 10% SFB más antibióticos (penicilina y estreptomocina a una concentración de 240µg/ml).

Se agitó la caja para distribuir las células uniformemente, y luego ésta se incubó a 37°C, con atmósfera de CO₂ del 5% y humedad del 85% durante 3 h con el fin de permitir la adhesión de las células a la caja.

Pasadas las 3 h, se retiró el medio de la caja (con la ayuda de una pipeta Pasteur y vacío) y se añaden 5 ml de medio D-MEM al 10% SFB fresco. Este procedimiento se lleva a cabo con la finalidad de eliminar el dimetilsulfóxido que se emplea en el proceso de congelación de las células.

Las células se mantienen en incubación algunos días para

permitir su desarrollo y confluencia, realizando cambio de medio cada 2 ó 3 días.

2. Pasaje de células (23).

La metodología descrita, se usa para todas las líneas celulares empleadas:

Cuando las cajas de cultivo han alcanzado una confluencia del 100%, se elimina el medio empleando succión y se adiciona tripsina (BRL, ver enzimas requeridas en REACTIVOS Y MEDIOS). La cantidad de tripsina adicionada dependerá del tamaño de la caja de cultivo: a cajas P25, se les agregará 2 ml de tripsina; a cajas P75, 3 ml; a cajas P150, 5 ml y para cajas Petri de 9 cm de diámetro, la cantidad de tripsina a adicionar será de 2 ml.

Una vez que se ha adicionado la enzima, las cajas se incuban por un período de 5 minutos a 37°C; después se sacan las cajas de la incubadora y se golpean suavemente en los costados para desprender las células del fondo de las cajas; cuando ésto ha ocurrido, se transfiere el contenido de todas las cajas a un tubo falcon que se centrifuga a 2500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, en rotor H1000B (Sorvall), para empastillar las células.

Mientras transcurre el período de centrifugación, se adiciona medio D-MEM suplementado con 10% SFB más anti-

bióticos, a cajas de cultivo nuevas y estériles (la cantidad de medio dependerá del tamaño de las cajas que se emplearán y de la dilución que se desee realizar).

Finalizada la centrifugación, se desecha la tripsina mediante aspiración, y el botón celular se resuspende en medio D-MEM al 10% SFB. La suspensión celular se distribuye en las cajas de cultivo nuevas y éstas se incuban a 37°C en atmósfera de CO₂ del 5 % y humedad del 85 %.

3. Congelamiento de células (23).

Las cajas de cultivo que se emplean para congelar, deberán tener una confluencia celular del 100 %; a dichas cajas se les retira el medio empleando succión. Se añade la cantidad de tripsina de acuerdo al tamaño de la caja (ver la técnica: "Pasaje de células") y se incuban a 37°C por 5 minutos.

Al finalizar la incubación se sacan las cajas de la incubadora y suavemente se golpean en los costados para desprender las células del fondo de las cajas. Las células se transfieren a un tubo falcon y se centrifugan por 5 minutos a 2500 rpm, a temperatura ambiente, en rotor H1000B (Sorvall).

Mediante aspiración se elimina la tripsina teniendo cuidado de no tocar el botón celular, el cual se resuspenderá en 10ml de medio D-MEM más antibióticos, suplementado con 20% de suero fetal de bovino. El tubo con la suspensión celular se centrifuga nuevamente a 2500 rpm durante 5 minutos.

El sobrenadante se desecha por succión, y el botón se resuspende en medio D-MEM suplementado con SFB al

20%, antibióticos y dimetilsulfóxido (DMSO) al 1.7%.

En tubos Nunc de 1.5 ml, se coloca 1 ml de la suspensión anteriormente preparada, y éstos se almacenan rápidamente a -70°C durante 24h, pasadas las cuales se transfieren los tubos al tanque de nitrógeno líquido, donde permanecerán hasta ser requeridas.

Debe hacerse notar, que el congelamiento a -180°C nunca debe hacerse inmediatamente, con el fin de conservar la viabilidad de las células.

4. Infección de células (23).

Se colocan en baño de agua a 37°C: la cepa viral MVA-E2 y la tripsina (que debe ser Worthington Biochemical, ver enzimas requeridas en REACTIVOS Y MEDIOS) y el medio D-MEM suplementado con SFB al 2%.

Posteriormente, los virus y la tripsina se agitan con ayuda de vortex; en condiciones de estricta esterilidad, se mezclan en un tubo Nunc la enzima y el virus (la tripsina debe quedar en una proporción 1:10). El tubo se incuba 15 minutos a 37°C.

Mientras transcurre el tiempo de incubación, se sacan de la incubadora 6 cajas de cultivo P75 (sembradas 1 ó 2 días antes de la infección) cuya confluencia celular sea del 100%; con la ayuda de una pipeta Pasteur y vacío, se les quita el medio a las cajas y a cada una se les añaden 3ml de medio D-MEM al 2 % SFB; cuando el período de tripsinización del virus ha concluido, se infectan las cajas con virus (10 PFU: Unidades formadoras de placa).

Incubar las cajas a 37°C en atmósfera de CO₂ del 5% y humedad del 85% por 1 h, durante la cual deberán agitarse cada 15 minutos (deslizándose el medio en direcciones per-

pendiculares).

La infección se detiene adicionando 12 ml de medio D-MEM al 10% SFB por caja. Las cajas de cultivo se regresan a la incubadora hasta el momento de su recolección.

NOTA: Este procedimiento fue el mismo que se siguió para infectar células con la cepa viral MVA y para cualquier línea celular descrita en esta tesis.

5. Recolección de células infectadas con virus.

(Comunicación personal: Dr. Ricardo Rosales).

Para realizar la recolección celular, se sacan las cajas de cultivo de la incubadora y se despegan las células del fondo de las cajas con la ayuda de un raspador de células.

Tanto el medio como las células desprendidas, se transfieren a un tubo falcon que es centrifugado a 2500 rpm, 20°C y durante 5 minutos, en rotor H1000B (Sorvall).

El sobrenadante es eliminado mediante aspiración, y el paquete celular que permanece en el fondo del tubo, se procesa inmediatamente (de no ser posible, el paquete celular puede guardarse a -20°C para su posterior procesamiento).

6. Aislamiento de RNA total (19).

Células de las líneas HeLa, BS-C-1, 3T3-F4 y CEF (Infectadas con las cepas virales MVA y MVA-E2) fueron empleadas para la obtención de RNA total.

Las células recolectadas se transfieren a tubos eppendorf (generalmente se manejó un tubo eppendorf por caja P75 recolectada). A cada tubo se le añaden 200 µl de una solución de tiocianato de guanidinio 4.5M (4.5 M tiocianato de guanidinio; 0.5 % N-Lauril sarcosin de sodio; 25 mM citrato de sodio; 0.1 M 2- mercaptoetanol; 25 mM EDTA; 0.1% anti-espumante A, pH 7.0). Posteriormente se realizan dos extracciones fenol-cloroformo, adicionando volúmenes de 200 µl y 300 µl respectivamente. (El fenol se satura con H₂O-DPC). Se agregan 150 µl de H₂O-DPC, y 300 µl de cloroformo, se mezclan en vortex y se centrifugan a 14,000 revoluciones por minuto, por 5 minutos, a temperatura ambiente. Se toma la fase acuosa y se le añaden 150 µl de H₂O-DPC y 300 µl de cloroformo (por tubo).

Se centrifuga nuevamente como se describió anteriormente; se toma la fase acuosa y a ésta se le adicionan 0.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.025 volúmenes de ácido acético glacial 11% (por tubo). Se mezcla en vortex y se

deja precipitando el RNA durante toda una noche a -20°C.

Al siguiente día la suspensión de RNA se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante (teniendo cuidado de no tocar la pastilla formada).

El botón se lava con 200 µl de etanol al 80 %, se mezcla (vortex) y se centrifuga 5 minutos a 14,000 rpm.

Se descarta el etanol al 80%, la pastilla de RNA se seca durante 10 minutos, en secador de vacío (marca SAVANT).

El RNA seco se resuspende en H₂O-DPC y se cuantifica como se explica a continuación:

2 µl de la solución de RNA, se diluyen en 398 µl de H₂O-DPC. Esta dilución se lee en el espectrofotómetro utilizando una lámpara de luz ultravioleta, a una longitud de onda de 260nm.

Para obtener los µg de RNA total que se tienen por µl, se emplea la siguiente equivalencia :

1 unidad de absorbancia = 40 µg RNA total/ml.

7. Preparación de geles de agarosa para muestras de RNA **(19).**

A 1g de agarosa (SEAKEM GTG) se le adicionan 81 ml de H₂O-DPC. La mezcla anterior se funde en el horno de microondas y se deja enfriar a una temperatura aproximada de 60°C para entonces adicionar 20 ml de solución amortiguadora MOPS 10X (0.4 M MOPS; 0.1 M acetato de sodio anhidro; 10 mM EDTA, pH 7.0) y 9 ml de formaldehído al 37 % (1.1 M final). Esta mezcla se agita y se vacía en una cámara de 10 cm X 7 cm; se coloca en seguida un peine que forma los carriles o pozos en el gel al solidificar la agarosa. Si al vaciar la agarosa se forman burbujas, éstas deben eliminarse pinchándolas con una aguja. Cuando el gel ha solidificado, se retira el peine teniendo cuidado de no dañar los carriles.

Las muestra de RNA que van a correrse en el gel, se tratan de la siguiente manera:

A 3 µg de RNA se le añaden 3 µl de solución amortiguadora MOPS 10 X, 10 µl de formamida (J.T. Baker ultrapura) 2 µl de formaldehído y 3 µl de solución amortiguadora de muestra (25% Ficoll 400; 1mM EDTA pH: 8.0; 0.4 % de azul de bromofenol).

Se mezcla y se desnaturaliza a 65°C en baño de agua durante 3 minutos. Se enfría rápidamente en hielo y se colocan las muestras inmediatamente en el gel.

La solución de corrida empleada es solución amortiguadora MOPS 1X; el gel se corre a 90 mA (120 volts), aproximadamente 1 h, a temperatura ambiente.

Terminada la corrida, el gel es colocado en un recipiente que contiene 100 ml de bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/ml disuelto en agua, por 10 minutos, con el fin de teñir los ácidos nucleicos (RNA).

El gel se destiñe durante una hora (o más) en agua destilada y posteriormente se observan las bandas de RNA, empleando un transiluminador con luz ultravioleta.

8. Síntesis de DNA complementario (cDNA). (54)

Por fines prácticos se realizó siempre la síntesis de la primera cadena únicamente empleando para ello volúmenes de RNA equivalentes a 3 µg, a los que se les adicionó H₂O-DPC (la suficiente para alcanzar un volumen de 28 µl). El RNA coloca en baño de agua a 70°C por 3 minutos.

Después se coloca rápidamente en hielo y ahí se le adicionan 10 µl de solución amortiguadora 5X (250 mM Tris-HCL, pH 8.0; 200 mM KCL; 40 mM MgCl₂ y 2 mM DTT), 5 µl de una solución que contiene 2.5 mM de cada uno de los 4 desoxirribonucleótidos, 5µl de oligo dT, cuya concentración es de 100 µg/µl, 1µl de RNAsin 40,000 U/ml) y una unidad de AMV transcriptasa reversa, en un volumen final de 50 µl.

Se incuba 90 minutos a 42°C. Terminada la síntesis, el cDNA se purifica mediante una extracción fenol-cloroformo y se almacenan a -20°C.

9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes de β -galactosidasa y E2.
(54).

- Amplificación del gen de β -galactosidasa:

1 μ g del cDNA sintetizado a partir del RNA obtenido de células de la línea 3T3-F4, fue amplificado en una mezcla de reacción de 100 μ l que constaba de 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001 % (p/v) gelatina, 2.5 mM de una mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos, 1 μ g de los oligonucleótidos 5'-2: 5'-GTTACGATGCGCCCATCTACACCAA-3' y 3': 5'-CCAACGCAGCACCATCACCGGA-3' y de 1 unidad de Taq polimerasa.

Se realizan 30 ciclos de amplificación cuyas condiciones son: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto seguido de un paso de alineación a 46°C por 2 minutos, y uno de elongación a 72°C por 1 minuto.

Finalmente, 10 μ l del producto de este PCR se analizan en geles de agarosa al 1 %, en solución amortiguadora TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA).

- Amplificación del gen E2:

El procedimiento que se llevó a cabo para la amplificación

de este gen, es el mismo descrito para la "Amplificación mediante PCR del gen E2 del virus de papiloma bovino (BPV)"; en este caso, las muestras de DNA que se amplificaron, fueron los cDNAs sintetizados partiendo del RNA aislado tanto de células HeLa como de células BS-C-1.

10. Geles de agarosa para muestras de DNA. (47)

Este tipo de geles fueron empleados para analizar muestras que contenían DNA.

Su preparación se realiza disolviendo un gramo de agarosa (SEAKEM GTG) en 100ml de solución amortiguadora TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). Esta mezcla se calienta a ebullición en el horno de microondas y se deja enfriar hasta una temperatura aproximada de 70°C, a la cual se adiciona bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/µl.

Posteriormente, se vacían 50 ml de la solución de agarosa a una cámara de 10cm X 7cm y se coloca inmediatamente un peine que formará los carriles al solidificar el gel.

Cuando ésto ha ocurrido, se retira cuidadosamente el peine y la cámara con el gel se coloca dentro de la cámara de electroforesis que contiene solución amortiguadora de corrimiento (TAE 1X).

Por otro lado, la muestra se prepara adicionando a 10 µl de la solución que contiene el DNA, 2 µl de solución amortiguadora de muestra (10 % glicerol, 0.1% SDS, TAE 1X, 0.001% azul de bromofenol); mezclar y colocar en el gel.

Correr el gel a 110 volts por un lapso de 1 a 1.30h a tempe-

ratura ambiente. Una vez que la corrida ha concluido las bandas de DNA se observan en un transiluminador con ayuda de luz U.V.

11. Detección de la proteína E2 en lisados de células infectadas con la cepa MVA-E2 (54).

Primeramente se infectan cajas de 6 pozos (de 35mm, COSTAR) que contienen células BS-C-1, con 10 PFU/célula de virus MVA y MVA-E2 (se infectaron 6 pozos con la cepa MVA-E2 y 2 pozos con la cepa MVA). Las células infectadas se incuban a 37°C, en atmósfera de CO₂ del 5% y humedad del 85%; 24 h después de la infección, se retira el medio de los pozos y éstos se lavan con 1ml de medio D-MEM sin metionina, se elimina el medio de lavado y a cada pozo se le añaden 500 µl de medio D-MEM sin metionina más 80 µCi de [³⁵S]-Metionina. Las células se incuban con la metionina en las mismas condiciones anteriormente mencionadas, hasta el momento de su recolección.

La recolección celular se realiza media, una y dos horas después de adicionado el aminoácido radiactivo. En cada punto se recolectaron 2 pozos de células infectadas con el virus MVA-E2 y en el último pozo se recolectaron además, los 2 pozos infectados con el virus MVA.

A cada uno de los puntos recolectados, se les agregan 200 µl de solución amortiguadora de lisis (100 mM NaCl; 100mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.5 % NP-40; 50 µl inhibidores de protea-

sas), se mezclan con ayuda de vortex y se colocan en hielo durante 10 minutos. Se centrifuga a 14,000 rpm por 5 minutos, se toma el sobrenadante y se coloca nuevamente en hielo.

Por otro lado, se toman 4 tubos eppendorf y a cada uno se le agregan aproximadamente 50 μ l de proteína A Sefarosa, se centrifugan por 10 segundos y se descarta el sobrenadante. Se realizan 3 lavados de esta proteína empleando volúmenes de 200 μ l de NaCl 150 mM; después del último lavado, se elimina totalmente el sobrenadante y se añaden 90 μ l de PBS más 10 μ l de anticuerpo dirigido contra la proteína E2 del virus de papiloma bovino. Se mezcla suavemente y se incuba a 4°C durante 1h (agitando los tubos cada cinco minutos). Se centrifuga 2 minutos a 14,000 rpm, se descarta el sobrenadante y se realizan 3 lavados con volúmenes de 200 μ l de PBS. Se retira el PBS del último lavado y se añaden 200 μ l de cada uno de los lisados celulares; se incuba nuevamente a 4°C, con agitación cada cinco minutos y se realizan 3 lavados más con PBS.

El contenido de los tubos se analiza mediante autorradiografía.

12. Gel de poliacrilamida al 12% para el análisis de la radioinmunoprecipitación de la proteína E2 (47).

Se preparan 2 geles: un gel separador, cuyo contenido es: 12 % acrilamida, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 % (p/v) SDS, 0.05 % persulfato de amonio, 6.6 mM TEMED y un gel concentrador, que se prepara mezclando: 4 % poliacrilamida, 0.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 % (p/v) SDS, 0.05 % persulfato de amonio y 6.6 mM TEMED.

Se prepara primero la mezcla del gel separador y se vacía rápidamente entre 2 placas de vidrio montadas previamente; inmediatamente se añade sobre este gel un poco de isopropanol. Cuando el gel separador ha polimerizado, se elimina el isopropanol, lavando con agua bidestilada. Se prepara el gel concentrador, se vierte de inmediato sobre el gel separador y se coloca el peine que ha de formar los carriles, una vez que este gel polimerice. Se retira el peine y los carriles se enjuagan con abundante agua bidestilada; montar las placas de vidrio con los geles polimerizados en la cámara de electroforesis, a la cual se le adiciona un litro de solución amortiguadora de corrida (0.08 % SDS, 153 mM glicina, 19 mM Tris-base).

Las muestras se preparan adicionando a cada una, 15 µl de solución amortiguadora de muestra (62.5 mM Tris-HCl, pH

6.8; 2 % (p/v) SDS; 5 % β -mercaptoetanol; 10 % glicerol; 0.01% azul de bromofenol). Se mezcla y se calienta por 5 minutos en baño de agua a ebullición.

Centrifugar las muestras por 2 minutos a 14,000 rpm; tomar los sobrenadantes y colocarlos en los carriles del gel.

El gel se corre a 200 volts, hasta que el colorante se ha salido del mismo; se desmonta la cámara y se sumerge el gel en glicerol al 10% por 5 minutos, para después secarlo por una hora. Exponer a autorradiografía, por 24h a -70°C.

C. TERCERA ETAPA :

**EVALUACION DEL EFECTO DE LA EXPRESION DEL
GEN E2 DE LA CEPA RECOMBINANTE SOBRE EL
CRECIMIENTO DE TUMORES DE LA REGION GENITAL.**

1. Aislamiento de DNA de biopsias (11).

La biopsia obtenida de un paciente fue sometida al siguiente procedimiento:

La muestra de tejido almacenada en nitrógeno líquido se cubre con papel parafilm y rápidamente se golpea con un martillo para romper dicha muestra en pequeños trocitos, antes de que se descongele y se haga blanda nuevamente.

Los trocitos de tejido se dividen en 2 tubos eppendorf y a cada uno de éstos se les adiciona 1ml de una solución que contiene 6 M GHCl, 0.1M acetato de sodio (pH 5.5) y PBS (pH 7.3). Los tubos se mezclan con ayuda de vortex y se incuban con agitación por 1 h, a temperatura ambiente.

Los tubos se centrifugan 5 minutos a 14,000 rpm y los sobrenadantes se juntan en un tubo falcon de 15ml donde se añaden 7 ml de etanol al 100% (frío), para insolubilizar el DNA, mismo que se colecta con la ayuda de una micropipeta y se transfiere a un tubo de 15ml nuevo.

El DNA, se lava 3 veces con 3 ml de etanol frío al 70%. Posteriormente el DNA se deja en etanol al 70% durante dos días, -20°C.

Se centrifuga el tubo para empastillar el DNA y se descarta el sobrenadante; el DNA se resuspende en 200 μ l de H₂O-DPC. Se purifica el DNA realizando una extracción fenol-cloroformo (con volúmenes de 200 y 300 μ l de cada uno respectivamente). Se resuspende el DNA en 100 μ l de H₂O-DPC.

2. Amplificación de DNA del virus de papiloma mediante PCR (94).

En esta ocasión el PCR se llevó a cabo para amplificar tanto el DNA obtenido de la muestra de tejido tumoral (biopsia), como DNA procedente de los tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 33 del virus de papiloma humano (plásmidos estándar, que contienen los genomas del virus).

La amplificación se realiza en mezclas de reacción de 10 μ l, que contienen: 200 ng de cada uno de los DNAs obtenidos, 3 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl; 0.001 % (p/v) gelatina, 100 μ M dATP, 100 μ M dGTP, 100 μ M dTTP, 10 μ M [α -³²P]-dCTP, 2 unidades de Taq DNA polimerasa y 10 picomoles de cada uno de los oligonucleótidos (GP5: 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATAC-3' y GP6: 5'-GAAAAA TAAACTGTAAATCA-3'). Las reacciones se incuban durante 40 ciclos, como se indica a continuación:

| Paso: | Ciclo 1 | Ciclo 2-39 | Ciclo 40 |
|-------|----------|------------|-----------|
| 1. D | 95°C, 5m | 95°C, 1m | 95°C, 1m |
| 2. A | 45°C, 1m | 45°C, 30s | 45°C, 30s |
| 3. E | 72°C, 1m | 72°C, 30s | 72°C, 5m |

D: Desnaturalización; A: Alineación; E: Elongación;
m: minutos; s: segundos.

Los productos de PCR, se analizan en geles de poliacrilamida al 6 % y 10 % de glicerol (Ver "Geles de poliacrilamida al 6% para análisis de DNA").

3. Geles de poliacrilamida al 6% para análisis de DNA.

(Comunicación personal: Bióloga Gpe. Cervantes).

A partir de un stock de acrilamida-bisacrilamida (19:1), se prepara una mezcla que contiene acrilamida al 6%, 10% de glicerol, 50 μ l de TEMED y 100 μ l de APS al 10 %; dicha mezcla se vacía rápidamente (evitando la formación de burbujas) entre 2 placas de vidrio previamente montadas y se coloca un peine que formará los carriles al polimerizar la poliacrilamida; se retira el peine y se enjuagan los carriles con agua bidestilada. Las placas de vidrio con el gel polimerizado, se montan en la cámara de electroforesis a la cual se le añade 1 litro de solución amortiguadora de corrida (TBE 1X: 0.09M Tris-borato, 0.002M EDTA).

Por otra parte, las muestras se preparan adicionando a 2 μ l del producto de PCR (obtenido según se describió en "Amplificación de DNA del virus de papiloma mediante PCR"), 2 μ l de solución desnaturante (0.1% SDS, 10mM EDTA) y 2 μ l de stop solution para la reacción (90 % formamida, 0.001 % azul de bromofenol); se mezcla y se desnaturaliza el DNA calentando en baño de agua a ebullición durante 5 minutos; colocar las muestras en el gel inmediatamente y correrlo a 40mA por 3h.

Al finalizar la corrida, se desmonta la cámara y el gel se sumerge por 15 minutos en una solución que contiene metanol al 10 % y ácido acético al 10 %, con el fin de fijar las muestras; se seca el gel durante una hora y se autorradio-grafia -70°C, por 24h.

VI. RESULTADOS:

A. RESULTADOS DE LA PRIMERA ETAPA.

La construcción del virus recombinante requirió de varios procesos previos: primeramente se realizó la amplificación del gen E2 del virus de papiloma bovino, mediante PCR (para lo que se empleó 1 µg del plásmido C59). El gen amplificado fue analizado en geles de agarosa al 1%.

Posteriormente, se llevó a cabo la preparación del plásmido pIII gpt dspA-E2 para lo cual fue necesario en primer lugar, transformar a la bacteria *E. coli* (cepa XL1-Blue) con el plásmido pIII gpt dsp A (proceso que nos permitió tener la cantidad de plásmido suficiente para la clonación); a continuación, el DNA del plásmido fue aislado (mediante la técnica de maxipreparación), purificado y digerido con las enzimas de restricción BamH-I y ASC-I. Después fue desfosforilado con la enzima fosfatasa alcalina.

Seguidamente el gen E2 del virus de papiloma se clonó en este plásmido utilizando la enzima ligasa.

Otro de los procesos previos a la construcción de la cepa MVA-E2, fue la preparación y purificación de un stock del virus MVA (la cuantificación espectrofotométrica del stock

preparado reportó 4.212×10^{11} virus/ml, lo que equivale aproximadamente a 4×10^9 PFU por mililitro).

Una vez que se tuvieron listos y purificados, tanto el stock de la cepa atenuada MVA como el plásmido recombinante pIII gpt dspA-E2, se procedió a infectar con el virus MVA, fibroblastos de embrión de pollo que después fueron transfectados con el plásmido recombinante; dentro de estas células se llevó a cabo una recombinación homóloga entre el DNA viral y el plásmido, lo cual dió lugar a la obtención de la cepa recombinante MVA-E2 (Figura No.1).

Los últimos experimentos de esta etapa fueron la selección de los virus recombinantes (por medio de rondas de purificación de placas, utilizando ácido micofenólico, xantina e hipoxantina) y la verificación de la Integración del gen E2 en 2 de las recombinantes obtenidas (Figura No.2).

Para obtener mayor información sobre cada uno de experimentos realizados para la construcción de la cepa recombinante, ver METODOS.

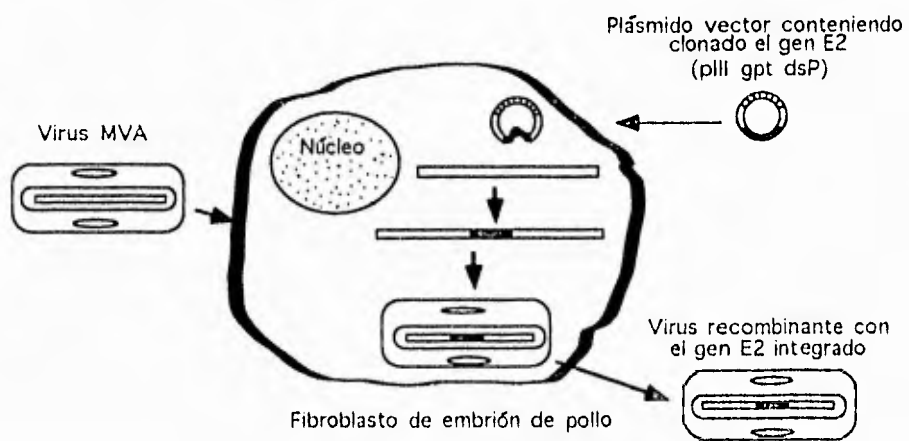


FIGURA No.1 : Construcción de una cepa recombinante con el virus de la vacinia, que contiene integrado el gen E2 del virus de papiloma. Fibroblastos de embrión de pollo fueron transfectados con el plásmido recombinante denominado pIII gpt dsp A-E2; posteriormente, estas células fueron infectadas con el virus MVA. Gracias a la recombinación homóloga que tiene lugar entre el plásmido y el DNA viral en el interior de la célula, es posible obtener una cepa viral recombinante que tiene integrado el gen E2 del virus de papiloma.

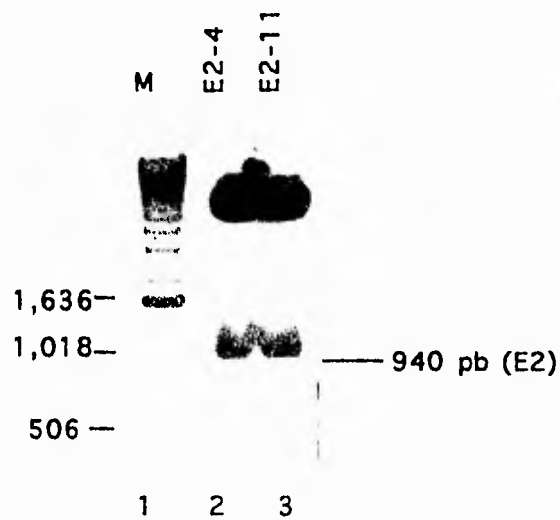


FIGURA No. 2: Análisis de la integración del gen E2 en las recombinantes E2-4 y E2-11. DNA de la cepa recombinante MVA-E2 fue purificado y sometido a la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos que permiten la amplificación de DNA que se encuentra integrado entre los flancos F1 y F2 del genoma de la vaccinia. Los productos del PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción BamH-I y ASC-I y analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%. En los carriles 1 y 2, se muestran los productos de PCR después de la digestión de las clonas E2-4 y E2-11 respectivamente. M denota marcadores de peso molecular para DNA de doble cadena.

B. RESULTADOS DE LA SEGUNDA ETAPA.

El objetivo de esta etapa era determinar que la cepa MVA-E2 es capaz de expresar adecuadamente el gen E2; para ello se infectaron primeramente células HeLa con las cepas virales MVA y MVA-E2. 24 h después de la infección se recolectaron estas células y se aisló el RNA total, el cual fue analizado en geles de agarosa al 1% (Figura No. 3).

Las cantidades de RNA total determinadas espectrofotométricamente fueron: 0.3024 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 0.8480 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para células HeLa infectadas con MVA y con MVA-E2, respectivamente.

Empleando 3 μg de cada uno de estos RNAs, se sintetizaron los cDNAs correspondientes mismos que fueron purificados y amplificados mediante PCR, con oligonucleótidos específicos para el gen E2. La figura No. 4 muestra los resultados de este experimento.

El segundo experimento de esta etapa, nos permitió observar cómo la proteína E2 es capaz de disminuir la actividad transcripcional de elementos de control del HPV (LCR) implicados en la formación de tumores cerviceo-anales, al infectar células 3T3-F4 (que contienen insertado en su

genoma, el gen de β -galactosidasa bajo el control del promotor LCR del HPV) con las cepas MVA y MVA-E2 y realizar los consiguientes aislamientos de RNA (0.2512 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, para células infectadas con MVA y 0.4240 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para células infectadas con MVA-E2), seguidos de la síntesis de cDNAs y amplificaciones mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen de β -galactosidasa; puede observarse una reducción en la expresión de este gen cuando se usa la cepa recombinante MVA-E2 (Figura No. 5).

El siguiente experimento consistió en infectar células BS-C-1 con la cepa recombinante MVA-E2, con el fin de analizar la estabilidad del RNA mensajero del gen E2; estas células se recolectaron 2, 3 y 4 días postinfección y se aisló el RNA; éste al cuantificarse espectrofotométricamente, dió los siguientes resultados:

| Tiempo de recolección: | $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA total |
|------------------------|-------------------------------------|
| 2 días postinfección | 0.223 |
| 3 días postinfección | 0.090 |
| 4 días postinfección | 0.106 |

3 μg de estos RNAs, se emplearon para la síntesis de cDNAs que se utilizaron para la amplificación del gen E2.

Los productos de este PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% y se muestran en la figura No. 6. Podemos ver claramente que el RNA mensajero de E2, es estable aun 4 días después de la infección.

Por último, se detectó la presencia de la proteína E2 en células infectadas con el virus MVA-E2. Células BS-C-1 fueron infectadas con las cepas MVA y MVA-E2; 24h después de la infección, las proteínas sintetizadas *de novo* por las células infectadas, se marcaron radiactivamente utilizando [³⁵S]-Metionina.

A diferentes tiempos se realizó la recolección de células, las cuales fueron lisadas y los lisados se utilizaron para un ensayo de radioinmunoprecipitación de la proteína E2.

La figura No. 7, muestra la autorradlografía del gel de agarosa al 12 %, que contiene los productos de este ensayo.

En la figura puede observarse claramente que la proteína E2 se encuentra presente en células infectadas con el virus MVA-E2 y no en los controles (células infectadas con MVA).

Los detalles de los experimentos realizados en esta etapa, se proporcionan en METODOS.

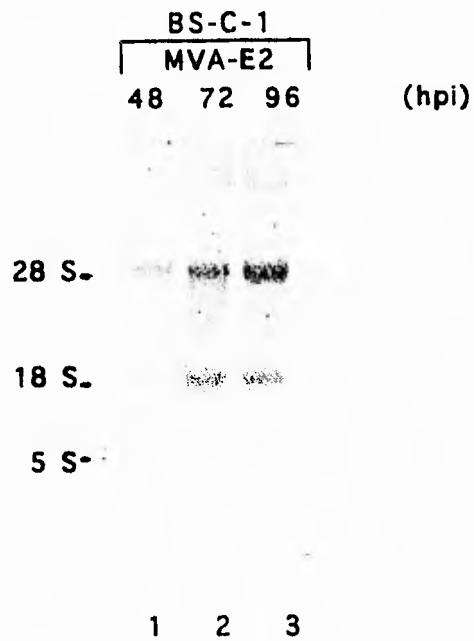


FIGURA No. 3: Análisis de RNA aislado de células BS-C-1 infectadas con la cepa recombinante MVA-E2. RNA fue aislado a diferentes tiempos postinfección de células BS-C-1 infectadas con el virus MVA-E2; posteriormente el RNA fue analizado en geles de agarosa al 1%. En los carriles 1, 2 y 3 se muestran 3 μ g de cada RNA; hpi, indica horas postinfección.

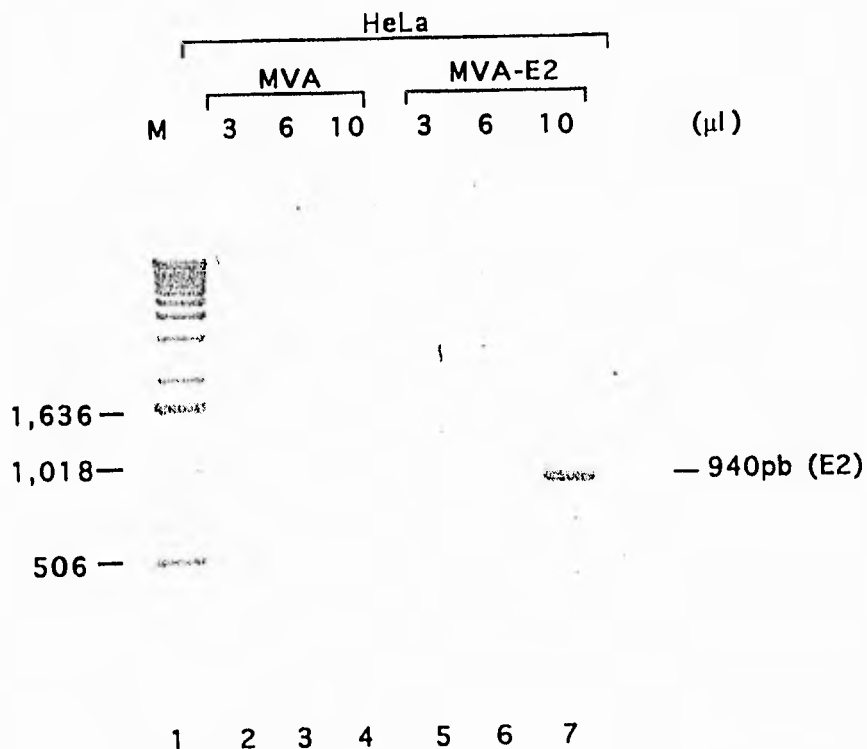


FIGURA No. 4 : La cepa recombinante MVA-E2 tiene la capacidad de expresar el gen E2. Muestras de cDNA sintetizado a partir de RNA aislado de células HeLa infectadas con el virus MVA o MVA-E2, fueron sometidas a un PCR empleando oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen E2. Los carriles 2 a 4 muestran el producto de PCR derivado de células HeLa infectadas con MVA y los carriles 5 a 7, de células infectadas con MVA-E2. M, corresponde a marcadores de peso molecular y la línea indica el tamaño en pares de bases del gen E2.

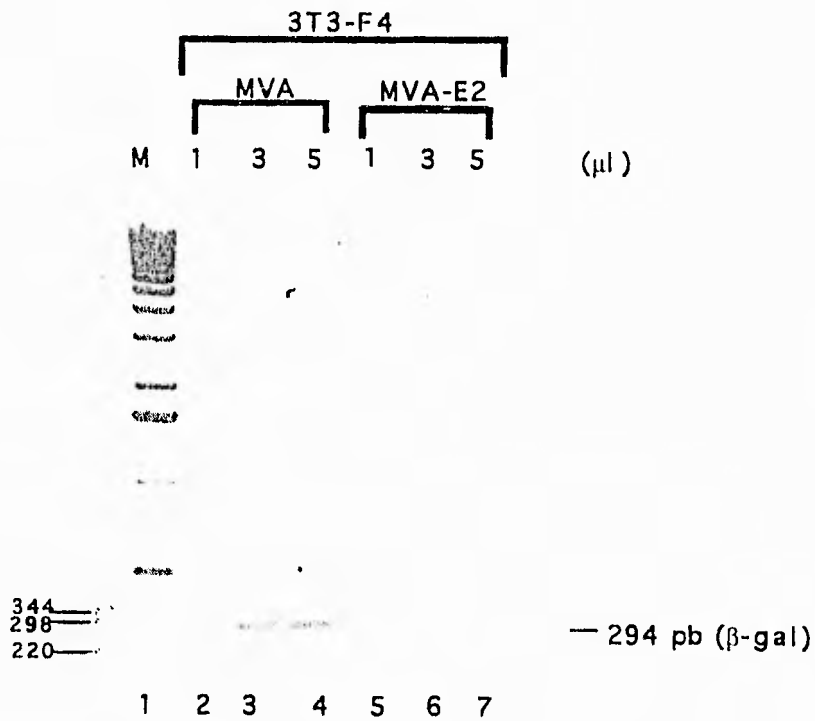


FIGURA No. 5: La expresión del gen E2 reduce la actividad transcripcional de los elementos de control del HPV involucrados en el desarrollo de tumores de la región genital. Análisis de la amplificación por PCR del cDNA de células 3T3-F4, infectadas con la cepa MVA (carriles 1 a 3) o con la cepa MVA-E2 (carriles 4 a 6); la cantidad de producto de PCR que contiene cada carril, se indica en la parte superior de la figura. Los números a la izquierda indican la posición y el tamaño, en pares de bases, de marcadores de peso molecular de DNA de doble cadena (carril M). El número a la derecha, indica el tamaño (en pares de bases) del producto del gen de β-galactosidasa.

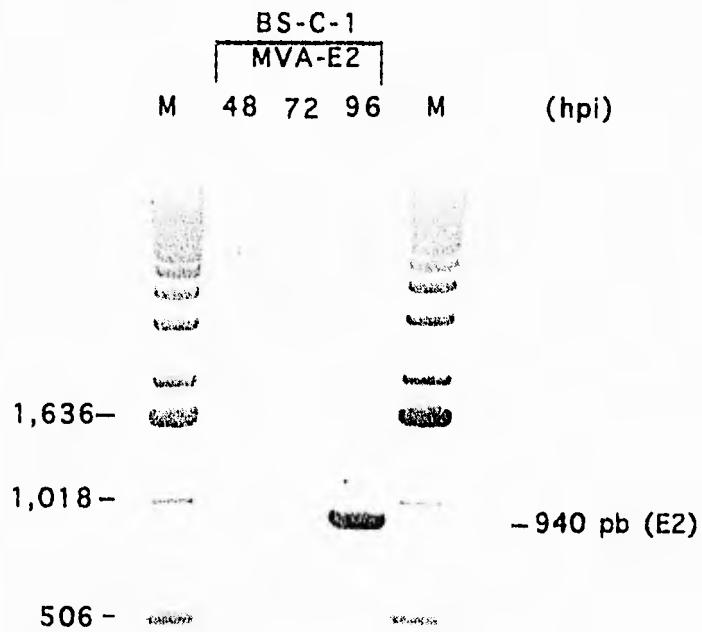


FIGURA No. 6: Estabilidad del mRNA de E2. Células BS-C-1 fueron infectadas con la cepa recombinante MVA-E2 y recolectadas a diferentes tiempos después de la infección (hpi). El RNA total fue aislado y usado para la síntesis de cDNA, el cual fue amplificado mediante la técnica de PCR. El producto de dicho PCR se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los carriles 2, 3 y 4 muestran el producto a 48, 72 y 96 horas postinfección. M corresponde a marcadores de peso molecular y las líneas indican el peso molecular de algunos marcadores (en pares de bases de DNA).

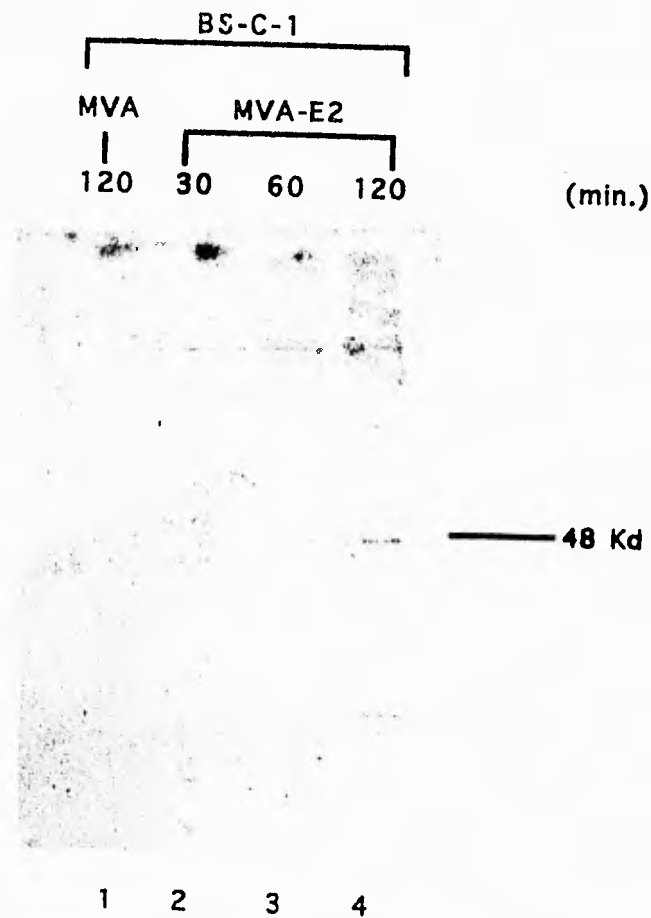


FIGURA No. 7: La proteína E2 es sintetizada por células infectadas con la cepa recombinante MVA-E2. La figura muestra la autorradiografía del ensayo de radioinmunoprecipitación realizado a lisados obtenidos de células infectadas con los virus MVA (carril 1) o MVA-E2 (carriles 2 a 4). Los números en la parte superior, indican el tiempo en minutos que duró el marcaje de la proteína E2, con [35 S]-Metionina. La línea a la derecha corresponde al peso molecular de E2 en kilodaltones.

C. RESULTADOS DE LA TERCERA ETAPA.

La evaluación del efecto de la cepa recombinante sobre el crecimiento de tumores de la región genital, se realizó en una paciente con tumoraciones en cérvix y vagina.

Como primer paso, se aisló el DNA de una biopsia obtenida del tumor y éste, junto con DNA aislado de diferentes tipos de HPV (controles), se sometieron a la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos que permitirían la amplificación de una región altamente conservada del genoma de los virus de papiloma humano, conocida como L1. Los productos del PCR fueron analizados mediante un gel de poliacrilamida al 6% en el que, por comparación de los patrones de bandas entre el DNA de la biopsia y el DNA de los distintos tipos de HPV analizados, se concluyó que el virus de papiloma tipo 18 era el agente causante de la formación del tumor (Figura No. 8).

Finalmente mediante inyección, se inoculó la cepa recombinante MVA-E2, en repetidas ocasiones y en diferentes zonas del lado izquierdo del tumor (el lado derecho del mismo sirvió como control). Cabe mencionar que en las primeras inyecciones se aplicaron dosis pequeñas de virus (Ver Tabla A, días 0-14); posteriormente, al no observar

ningún efecto secundario y notar disminución en el desarrollo tumoral, se procedió a Inyectar dosis mayores.

El resultado más interesante de esta etapa es que, además de la disminución en el desarrollo tumoral se observó también, una disminución de aproximadamente el 40 % en el tamaño del tumor.

La Tabla A muestra los períodos en los que se aplicó cada Inyección, la dosis correspondiente y en forma cualitativa, la disminución en el desarrollo y tamaño del tumor observadas:

| DIA | PFU Inyectadas: | Disminución del desarrollo tumoral: | Disminución del tamaño tumoral: |
|-----|------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| 0 | 1×10^7 | No existe | — |
| 7 | 1×10^7 | Existe | +++ |
| 14 | 1×10^7 | Existe | +++ |
| 21 | 1×10^8 | Existe | ++ |
| 35 | 2×10^8 | Existe | ++ |
| 42 | 5×10^8 | Existe | ++ |
| 49 | 8×10^8 | Existe | ++ |
| 63 | 10×10^8 | Existe | ++ |
| 70 | 12×10^8 | Existe | ++ |

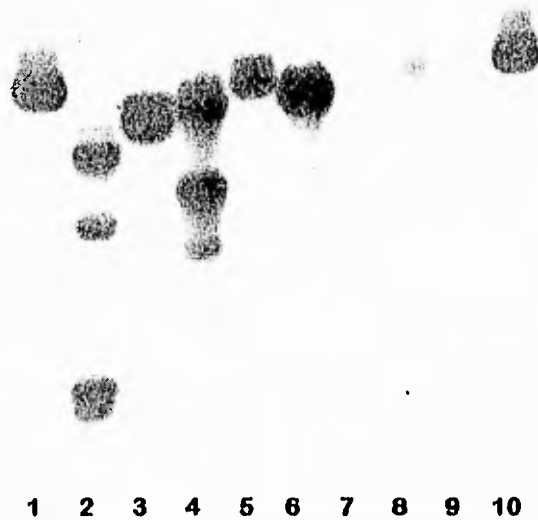


FIGURA No. 8: Detección de HPV en una muestra de tejido tumoral (biopsia). DNA genómico aislado a partir de una biopsia de tejido tumoral, así como DNA obtenido de diferentes tipos de HPV, fueron sometidos a la técnica de PCR empleando oligonucleótidos específicos para la amplificación de la región L1 (Región altamente conservada del genoma de los virus de papiloma). La figura muestra el análisis de los productos de PCR mediante gel de poliacrilamida al 6%; los carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7, contienen el producto de PCR del DNA aislado de los tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31 y 33 respectivamente. En el carril 8 se observa el producto de PCR del DNA genómico (compárese este carril con el carril 5). Los carriles 1 y 10, contienen solución desnaturalizante (Ver METODOS), mientras que el carril 9, sólo contiene agua.

VIII. DISCUSION Y CONCLUSIONES:

En el presente proyecto de investigación se logró la construcción de la cepa recombinante MVA-E2, empleando la cepa atenuada del virus de la vaccinia y el gen E2 del virus de papiloma bovino; ésto se llevó a cabo mediante la recombinación homóloga ocurrida entre el plásmido recombinante pIII gpt dspA-E2 y el DNA del virus MVA, en fibroblastos de embrión de pollo.

Los recombinantes así obtenidos, se seleccionaron por medio de purificaciones consecutivas de placas virales, utilizando como drogas de selección ácido micofenólico, xantina e hipoxantina. El ácido micofenólico, interfiere con la replicación del virus MVA y reduce severamente el tamaño de las placas virales; éste efecto se elimina gracias a la expresión del gen gpt de la bacteria *E. coli*, en presencia de xantina e hipoxantina, por lo que la co-expresión del gen gpt en este caso, constituyó un sistema de selección bastante conveniente.

Una vez seleccionados los recombinantes, se desarrollaron una serie de experimentos cuyos resultados demostraron que:

a) la cepa recombinante es capaz de expresar el gen E2.

- b) las células infectadas con la cepa recombinante, sintetizan la proteína E2.**
- c) la actividad transcripcional de los elementos de control del HPV implicados en la formación de tumores genitales, es reducida por la expresión del gen E2.**

Estos resultados además de los obtenidos en experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Ricardo Rosales con animales inmunodeficientes (resultados no publicados), probaron que la expresión del gen E2 es capaz de reprimir la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 y por lo tanto, evitar la inmortalización celular y la formación de tumores de la región genital, originados por el virus de papiloma; por otro lado, experimentos recientes desarrollados en la Universidad de California mostraron que la inmunización con las proteínas E1 y E2, son capaces de estimular la regresión de tumores inducidos por el virus de papiloma en conejos cola de algodón (79). La regresión de los tumores, fue debida a la respuesta inmune celular generada por las proteínas E1 y E2.

Todos los resultados mencionados sumados a las ventajas que proporciona el uso de la cepa MVA como vector de expresión del gen E2 (tales como que dicha cepa es capaz de inducir la síntesis de grandes cantidades de la proteína

E2, que es totalmente avirulenta y además es la única probada en humanos), nos permitieron proponer el uso de la cepa recombinante en la terapéutica de tumores cervicococales.

Contando con la colaboración del Dr. Abelardo Monjes (del Hospital Mocol), se comenzó el tratamiento con la cepa MVA-E2 de una paciente con tumor en cuello y vagina (inducido por el virus de papiloma tipo 18, según muestran los resultados de los experimentos efectuados en la última etapa de esta tesis).

Al cabo de más de 2 meses de tratamiento, se observó disminución en el crecimiento del tumor e incluso una disminución en el tamaño del mismo, de aproximadamente el 40%; lo anterior se determinó únicamente en forma cualitativa debido a que al inyectar el virus MVA-E2 en el tumor, éste adquiría una consistencia esponjosa difícil de medir y de volumen aparentemente mayor, que con el paso del tiempo se desprendía dando como resultado final, una reducción en el tamaño de la masa tumoral.

Los resultados obtenidos muestran claramente que la cepa recombinante MVA-E2 puede reducir el crecimiento de tumores humanos de la región genital; ésta reducción pue-

de atribuirse a la presencia de la proteína E2 en las células tumorales (lo cual ejerce un control negativo sobre la expresión de los oncogenes del virus de papiloma) y además, a una respuesta celular provocada tanto por la proteína E2, como por el virus de la vaccinia (77). Es importante mencionar que durante el tratamiento, nunca se observaron efectos secundarios.

Actualmente, se pretende tratar más pacientes con tumores de la región genital, cuyo tamaño de masa tumoral sea menor, con el fin de obtener más resultados y evaluar adecuadamente la cantidad específica y necesaria de virus que se debe emplear para reducir totalmente la masa tumoral.

Con esto se da un paso adelante en la investigación para el tratamiento de tumores de la región cérvico-anal.

Por otro lado, este trabajo es el primero que se realiza a nivel mundial utilizando la cepa atenuada del virus de la vacuna (MVA) para realizar terapia génica.

IX. SIGLAS Y ABREVIATURAS.

- HPV: Virus de papiloma humano.
- BPV: Virus de papiloma de bovino.
- PV: Virus de papiloma.
- MVA: Cepa atenuada del virus de la vacinia (Modified Vaccinia Ankara).
- CaCU: Cáncer cérvico-uterino.
- CIN: Neoplasia intraepitelial cervical.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- ORF: Marco de lectura abierto.
- LCR: Promotor del virus de papiloma, que regula la expresión de los onco-genes virales E6 y E7.
- SFB: Suero fetal de bovino.
- D-MEM: Medio Esencial Mínimo Dulbecco.
- CEF: Fibroblastos de embrión de pollo.
- HeLa: Células derivadas de carcinoma de cérvix humano.
- BS-C-1: Células epiteliales derivadas de riñón de mono verde africano.
- 3T3-F4: Células de embrión de ratón, que expresan consecutivamente el gen de β -galactosidasa bajo el control del promotor LCR del HPV.
- Episomal: El DNA viral no se encuentra integrado al genoma celular.

- pb: Pares de bases.
- kDa: Kilodaltones (1,000 daltones).
- μg : Microgramo (1×10^{-6} gramos).
- μl : Microlitro (1×10^{-6} litros).
- μm : Micrómetros (1×10^{-6} metros).
- nm: Nanómetro (1×10^{-9} metros).
- ng: Nanogramo (1×10^{-9} gramos).
- mM: Milimolar (1×10^{-3} mol).
- rpm: Revoluciones por minuto.

X. BIBLIOGRAFIA :

- 1 . Altenburger, W., Suter, C. P. & Altenburger, J.; (1989); Arch. Virol.; 105:15-27.
- 2 . Arzoglou, P., Drillon, R., Kirn, A.; (1978) ; Virology; 95:211-214.
- 3 . Barbosa, M. S., Lowy, D. R. and Schiller, J. T.; (1989); Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins; J. Virol.; 63: 1404-1407.
- 4 . Baroudy, B. M., Vankatesan, S., Moss, B.; (1982); Cell; 28: 315-324.
- 5 . Baroudy, B. M. and Moss, B.; (1980); Purification and characterization of a DNA-dependent RNA polymerase from vaccinia virions; J. Biol. Chem.; 255: 5388-5395.
- 6 . Bauer, W.R., Rössner, E.C., Kates, J., Patzko, J.; (1977); PNAS, USA; 74: 1841-1845.
- 7 . Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonka, S., Waln-Hobson, S., Orth, G.; (1986); A new type of human papillomavirus associated with genital neoplasias; Nature; 321:246.
- 8 . Bernard, B. A., Bally, C., Darmon, M., Thierry F., Yaniv, M.; (1989); The intact HPV-18 E2 gene product is a transcriptional repressor of the homologous E6 promoter in human keratinocytes; J. Virol.; 63: 4317-4324.
- 9 . Berumen, J., Casas, L., Segura, E., Amezcua, J. L. and García-Carranca, A.; (1994); Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes; Int. J. Cancer,

56: 640-45.

10. Boshart, M., Glssmann, L., et al.; (1984); A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer; EMBO J.; 3: 1151.
11. Bowtell, D. D. L.; (1987); Rapid isolation of eukariotic DNA; Analytical Biochemistry; 162: 463-465.
12. Brinton, L. A.; (1986); Current epidemiological studies-emerging hypothesis; Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer; p. 17; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. York.
13. Broker, T. R. , Botchan, M.; (1986); Papillomaviruses: retrospectives and prospectives; Cancer Cells; 4: 17.
14. Broyles, S. S. and Moss, B.; (1988); DNA-dependent ATPase activity associated with vaccinia virus early transcription factor; J. Biol. Chem.; 263: 10761-10765.
15. Burghardt, E.; (1986); Natural history of cervical lesions; Banbury report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer; p. 81; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
16. Campo, M. S.; (1988); Viral and cellular oncogenes in papillomovirus-associated cancers; Br.J.Cancer, 58 (Suppl.IX): 80.
17. Cass, C. E.; (1984); Cancer Cells, Audiovisual, University of Alberta.
18. Chang, A., Metz, D.H.; (1976); Further investigations on the mode of entry of vaccinia virus into cells; J. Gen. Virol. 32: 275-282.

19. Chirgwin, J.M., et al.; (1979); *Biochemistry* 18: 5294-5299.
20. Cortinas, C.; (1991); *Cáncer: Herencia y ambiente*; Publicado por CONACYT, SEP y Fondo de Cultura Económica; 1a. edición.
21. Dales, S., Kajloka, R.; (1964); *Virology*; 24: 278-294.
22. Dartmann, K., Schwarz, E., Gissmann, L., zur Hausen, H (1986); The nucleotide sequence genome organization of human papillomavirus type 11; *Virology*, 151:124.
23. Davis, B. D., Dulbecco, R., et al.; (1973); *Microbiology*, Second edition; Harper International edition.
24. Desaintes, C.; Hallez, S.; Van Alphen, P. and Burny A.; (1992); Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16; *J. Virol.*; 66: 325-333.
25. de The, G.; (1984); *Sobre la pista del cáncer*; Editorial CONACYT y Ediciones Castell Mexicana.
26. Dulbecco, R.; (1984); *La naturaleza del cáncer*; Mundo Científico.
27. Dürst, M., Croce, C. M., Gissmann, L., Schwarz, E., Huabner, K.; (1987); Papillomavirus sequences Integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:1070.
28. Earl, P. L., Moss, B.; (1989); *Genetic Maps*; De. S. J. O'Brien; p. 1.138-1.148; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, New York.
29. García-Carrancá, A., Thierry, F., Yaniv, M.; (1988); Interplay of viral and cellular proteins interaction along the long

control region of human papillomavirus 18; *J. Virol.*; 62: 4321.

30. Gariglio Patricio y García Carrancá A.; (1989); Papillomavirus humano y cáncer cérvico-uterino; *Adel. Microbiol. Enf. Infecc.*; 8: 45.
31. Giri, Y., Danos, O.; (1986); Papillomavirus genomes: from sequence data to biological properties; *Trends in Genetics*; 2: 227.
32. Gissmann, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovski, U zur Hausen, H.; (1983); Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers; *PNAS*. 80: 560.
33. Gissmann, L. and zur Hausen, H.; (1976); Human papillomavirus DNA: Physical mapping and genetic heterogeneity; *PNAS*. 73: 1310.
34. Green, G.H.; (1978); Cervical cancer and cytology screening in New Zealand; *Br. J. Obstet. Gynecol*; 85: 881-886.
35. Hakama, M.; (1986); Efficacy of screening for Cervical Cancer; p.45; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
36. Haugen, H.T., Turek, L.P., Mercurio, F.M., et al.; (1988); Sequence-specific and general transcriptional activation by the bovine papillomavirus 1 E2 trans-activator require an N-terminal amphipatic helix-containing E2 domain; *EMBO J*; 7: 4245.
37. Hirochika, H., Hirochika, R., Broker, T.R., Chow L. T.; (1988); Functional mapping of the human papillomavirus type 11 transcriptional enhancer and its interaction with the transacting E2 protein; *Genes Develop*; 2: 54.

38. Ichihashi, Y., Matsumoto, S. & Dales, S.; (1971); Biogenesis of poxviruses: Role of A-type inclusions and host cell membranes in virus dissemination; *Virology*; 46: 507-532.
39. Joklik, W. K.; (1964); *J. Mol. Biol.*; 8: 263-276.
40. Kieny, M. P., Lathé, R., Drillien, R., Spehner, D, et al.; (1984); Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus; *Nature*; 312: 163-166.
41. Kleiman, J. H. and Moss, B.; (1975); Characterization of protein kinase and two phosphate acceptor proteins from vaccinia virions; *J. Biol. Chem*; 250: 2430-2437.
42. Kovacs, G. R., Rosales, R., Keck, J. G. and Moss, B.; (1994); Modification of the cascade model for regulation of vaccinia virus gene expression: Purification of a prereplicative, late-stage-specific transcription factor; *J. Virol.*; 68: 3443-3447.
43. Mackett, M., Smith, G. L. and Moss, B.; (1982); *PNAS, USA*; 79:7415-7419.
44. Mackett, M., Smith, G. L. and Moss, B.; (1984); General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes; *J. Virol.* 49:857-864.
45. Mackett, M., Yilma, T., Rose, J. K., Moss, B.; (1985); Vaccinia virus recombinants: expression of VSV genes and protective immunization of mice and cattle; *Science*; 227: 433-435.
46. Mallon, R., Wojciechowicz, D. and Defendi, V.; (1987); DNA-binding activity of papillomavirus proteins; *J. Virol.*; 61: 1655-1660.
47. Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E. F.; (1989); *Molecular*

cloning, a laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press.

48. **Martin, S.A., Paoletti, E., Moss, B.;** (1975); Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-)-methyl transferase from vaccinia virions; *J. Biol. Chem.*; 250: 9322-9329.
49. **Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. & Stickl, H.;** (1975); *Infection*; 3, 6-14.
50. **McDougall, J., Beckmann, A., Galloway, D.;** (1986); The enigma of viral nucleic acids in genital neoplasia; *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*; p.199; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
51. **Meanwell, C., Cox, M., Blackledge, G., Maitland, N.;** (1987); HPV-16 DNA in normal and malignant cervical epithelium: implications for the aetiology and behaviour of cervical neoplasia; *Lancet* 1, 703.
52. **Morgan, C.;** (1976); *Virology*; 73: 43-58.
53. **Moss, B.;** (1989); *Virology*, ed. B. N. Fields, D. M. Knipe, R. M. Chanock, M. S. Hirsch, J. Melnick; pp 2079-2112.; New York.
54. **Moss, B.;** (1993); *Current protocols in Molecular Biology*; Wiley Interscience, USA.
55. **Moss, B., Rosenblum, E. N., Gershowitz, A.;** (1975); Characterization of a polyribadenylate polymerase from vaccinia virions; *J. Biol. Chem.*; 250: 4722-4729.
56. **Moss, B.;** (1990); Regulation of vaccinia virus transcription; *Annu. Rev. Biochem.*; 59: 661-688.

57. Nelson, J. H., Averette, H. E., Richart, R. M.; (1984); Dysplasia, carcinoma *in situ* and early Invasive cervical carcinoma; Cancer J. for Clinicians; 34: 306-327.
58. Panicall, D. and Paoletti, E.; (1982); PNAS, USA; 79:4927-4931.
59. Paoletti, E. and Grady, L. J.; (1977); Transcriptional complexity of vaccinia virus *in vivo* and *in vitro*; J. Virol.; 23:608-615.
60. Paoletti, E., Lipinskas, B. R.; (1978); Soluble endoribonuclease activity from vaccinia virus: specific cleavage of virion-associated high-molecular-weight RNA; J. Virol.; 26:822-824.
61. Paoletti, E., Lipinskas, B. R., Samsonoff, L., et al.; (1984); PNAS, USA; 81:193-197.
62. Paoletti, E., Rosemond-Hornbeak, H., Moss, B.; (1974); Two nucleic acid-dependent nucleoside triphosphate phosphohydrolases from vaccinia virus; 249: 3273-3280.
63. Parkin, D. M.; (1984); Estimates of worldwide frequency of twelve major cancers; Bull WHO; 62: 163- 182.
64. Peto, R.; (1986); Introduction: Geographic patterns and trends; Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer; p.3; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; New York.
65. Pfister, H., Gissmann, L., zur Hausen, H.; (1977); Partial characterization of the proteins of human papillomaviruses (HPV) 1-3; Virology; 83: 131.
66. Phelps, W. C., Howley, P. M.; (1987); Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 DNA; J. Virol.; 61: 1630-1638.

67. Phelps, W. C., Yeo, C. L., Munger, K. and Howley, P. M.; (1988); The human papillomavirus type 16 E7 genes encode transactivation and transformation functions similar to adenovirus E1a; *Cell* ; 53: 539-547.
68. Quinnan, G. V.; (1984); *Vaccinia Viruses as vectors for vaccine antigens*; Editorial Elsevier.
69. Rawls, W. E., Marrett, L. D., Reeves, W. C.; (1986); An analysis of the association between herpes simplex virus type 2 antibodies and cervical cancer; *Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer*; p.187; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor; New York.
70. Reid, R., Crum, C. P., Herschman, B. R., et al; (1984); Genital warts and cervical cancer. III. Subclinical papillomaviral infection and cervical neoplasia are linked by a spectrum of continuous morphologic and biologic change; *Cancer*; 53: 943-953.
71. Rosales, R., Sutter, G. and Moss, B.; (1994); A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes; *PNAS, USA*; 91: 3794-3798.
72. Rosales, R., Harris, N., Ahn, B. and Moss, B.; (1994); Purification and identification of a vaccinia virus encoded intermediate stage promoter-specific transcription factor that has homology to eukaryotic transcription factor Sp1 (TFIIIS) and an additional role as a viral RNA polymerase subunit; *J. Biol. Chem.*; 269: 14260- 4267.
73. Rotkin, Y. D.; (1973); A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents; *Cancer Res.*, 33:1353-1367.
74. Santos, E., Rodríguez, V. J.; (1987); *El cáncer*; Prensa Científica.

76. Schwarz, E., Freese, W.K., Gissmann, L., et al.; (1985); Structure and transcription of human papillomavirus sequence in cervical carcinoma cells; *Nature*; 314:111
77. Scheffner, M.H., Bauer, H.M., Hoover, R.N., Glass, A.G., Rush, B.B., et al.; (1993); Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia; *J. Natl Cancer Inst.*; 85: 958-964.
78. Secretaría de Salubridad y Asistencia; Registro Nacional del Cáncer; (1987); Editorial Médica; México.
79. Sedman, S., Barbosa, M., Vass, W., Hubbert, N., Haas, J., Lowy, D. and Schiller; (1991); The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture; *J. Virol.*; 65: 4860-4866.
80. Selvakumar, R., Borenstein, L. A., Lin, Y., et al.; (1995); Immunization with nonstructural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus-induced papillomas; *J. Virol.*; 69: 602-605.
81. Shodell, M.; (1986); Preface, Banbury Report 21: Viral Etiology of Cervical Cancer; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, New York.
82. Shuman, S.; (1989); Functional domains of vaccinia virus mRNA capping enzyme; *J. Biol. Chem.*; 264: 9690-9695.
83. Singer, A.; (1982); Preclinical Neoplasia of the cervix: Proceedings of the 9th study group; Royal College of Obstetricians and Gynecologists; p.1-14; London.
84. Smith, G.L., Mackett, M., Moss, B.; (1983); Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen; *Nature*; 302: 490-495.

84. Smith, G. L., Murphy, B.R., Moss, B.; (1983); PNAS, USA; 80:7155-7159.
85. Smith, G. L., Godson, G. N., Nussenzweig, V., et al; (1984); *Plasmodium knowlesi* sporozoite antigen: expression by infectious recombinant vaccinia virus; Science; 224: 397-399.
86. Smotkin, D. and Wettstein, F. O.; (1987); Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in cervical cancer and cancer derived cell line and identification of the E7 protein; PNAS; 83: 4680-4684.
87. Spalholz, B. A., Yang, Y.C., Howley, P. M.; (1987); Trans-activation of the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product; J. Virol.; 61: 1630-1641.
88. Spencer, E., Loring, D., Hurwitz, J., Monroy, G.; (1978); PNAS, USA; 4793-4797.
89. Spencer, E., Shuman, S., Hurwitz, J.; (1980); Purification and properties of vaccinia virus DNA -dependent RNA polymerase; J. Biol. Chem.; 255: 5388-5395.
90. Sutter, G. and Moss, B.; (1992); Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes; PNAS, USA; 89:10847-10851.
91. Takebe, N., Tsunokawa, Y., Nozawa, S., Torada, M., Sugimura, T.; (1987); Conservation of E6 and E7 regions of human papillomavirus types 16 and 18 present in cervical cancers; Biochem Biophys Res Commun; 143:837-844.
92. Thierry, F. and Yaniv, M.; (1987); The BPV-1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV-18 regulatory region; EMBO J.; 6: 3391-3397.
93. Tooze, J.; (1981); DNA tumor viruses; Cold Spring Harbor

Laboratory; Second edition (Parte 2).

94. **Van Der Brule, A. J. C., Snijders, P.J.F., Gordijn R.L.J., et al.;** (1990); General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas; *Int. J. Cancer*; 45: 644-649.
95. **Waxman, J., Sikora, K.;** (1989); *The Molecular Biology of Cancer*; Blackwell Scientific Publications.
96. **Werness, B. A., Levine, A. J. and Howley, P. M.;** (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53; *Science*; 248: 76-79.
97. **zur Hausen, H.;** (1977); Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas; *Curr. Top. Microbiol. Immunol*; 78:1
98. **zur Hausen, H.;** (1987); Papillomaviruses in human cancer; *Cancer*; 59: 1692-1696.