



47
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“ USO DE VECTORES RECOMBINANTES, HECHOS
CON EL VIRUS DE LA VACCINIA, QUE EXPRESEN
LA PROTEINA E2 DEL VIRUS DEL PAPILOMA
HUMANO, EN LA DISMINUCION DE TUMORES ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A ,
IRMA GABRIELA GONZALEZ HERRERA



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

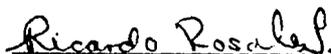
JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profa. Marisol López López.
VOCAL: Prof. Ricardo Rosales Ledezma.
SECRETARIO: Prof. Homero Hernández Montes.
1º SUPLENTE: Profa. Aída Pérez Navas.
2º SUPLENTE: Prof. Rogelio Rodríguez Sotres.

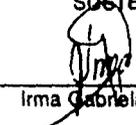
Sitio donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, (UNAM)

ASESOR DEL TEMA


Dr. Ricardo Rosales L.

SUSTENTANTE


Irma Gabriela González H.

gracias...

a mis padres, por su amorosa entrega y abnegada lucha;

a Caty y Arce, mis hermanas, por su comprensión y cariño;

al Dr. Ricardo Rosales, por su paciencia y desinteresada ayuda;

al Dr. Alejandro García C. y a todo su maravilloso equipo, por sus colaboraciones y amistad;

al Dr. Arhur Mayr por la donación de la cepa MVA

**a mis sinodales, por su tiempo y amable trato
(especialmente a la maestra Marisol Lopez);**

**a quienes de alguna manera me ayudaron en la realización de este trabajo
(muy en especial a: Bernardo, Gonzalo, Luis S., Vero y Pili Ramos,
Gustavo, Alex, Josune, Hayanin y Paco);**

al personal del Depto. de Infectología (investigación) de INNSZ, por su interés y apoyo;

a mis amigas de toda la vida: Alex Bejarano, Betsabee, Aurora, Vero Ramos;

**a todos mis excompañeros y ahora colegas, de la generación 1989-1993 de
Q.F.B., por llenar mi memoria de recuerdos gratisimos;**

a los maestros que dejaron huella en mi persona;

Alonso, por todo;

**Pero sobre todo, gracias a Dios por llenarme de vida, valor y de fé para llegar
a ver realizados mis anhelos.**

Dedicada....

A Graciela y Raúl, mis amadísimos padres. porque de ellos aprendí a valorar la honestidad, la valentía, la lealtad y el amor al trabajo.

A Hassan Bassi, por su huella imborrable.

A la memoria de Silvia Olivares.

*"El individuo superior no siempre triunfa,
pero se esfuerza y vá logrando;
el individuo inferior nunca se esfuerza,
pero aveces se impone".*

CONFUCIO.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	X

I.- INTRODUCCIÓN.

El problema del cáncer a nivel mundial	1
El cáncer cervico-uterino en México	2
Marco teórico	
Genética del cáncer	4
Oncogenes y genes supresores de tumor	6
Los papilomavirus humanos	11
Taxonomía	12
Biología molecular de los HPV	15
Proteína E2	15
Proteínas E6 y E7	16
Especificidad tisular	17
Posibles mecanismos de transformación por HPV	19
Vectores de clonación como clave de la terapia génica	20
El virus de la vaccinia como vector de clonación	20
Taxonomía	23
Ciclo de replicación del VV	24
Biología molecular del VV	25
II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29

III.-MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico	31
Medios de cultivo.....	32
Soluciones y reactivos	33
Metodología	36
A) Obtención de la cepa recombinante.....	36
B) Comprobación de la represión en la región LCR por la proteína E2 recombinante en cultivos celulares	45
C) Represión de la expresión de los oncogenes E6 y E7 por la proteína E2 recombinante en tumores.....	50

IV.-RESULTADOS.

A) Obtención de la cepa recombinante MVA-E2	52
B) La proteína E2 recombinante reprime la actividad de LCR de HPV cultivos celulares	55
C) La proteína E2 recombinante disminuye la expresión de los oncogenes E6 y E7 en tumores.....	62

V.- DISCUSION	68
----------------------------	-----------

VI.-CONCLUSIONES	77
-------------------------------	-----------

VII.-BIBLIOGRAFÍA	78
--------------------------------	-----------

APÉNDICES

APÉNDICE A	86
APÉNDICE B.....	91

ABREVIATURAS

ABS	Albúmina Sérica Bovina..
Act. Esp.	Actividad específica de la enzima
AF	Amortiguador de fosfatos.
AL	Amortiguador de lisis.
β-GAL	Gen Lac Z insertado en el plásmido LCR- β GAL.
β-gal	Enzima β -galactosidasa, expresada por el gen Lac Z.
BPV-1	Bovine Papilloma Virus type 1. (Virus del Papilloma Bovino tipo 1).
CaCU	Cáncer Cérvico-Uterino.
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa.
CEF	Chicken Embrio Fibroblast (fibroblastos de embrión de pollo).
CIN	Cervix Intraepithelial Neoplasm (neoplasia intraepitelial cervical).
CIP	Caw intestine phosphatase (fosfatasa ácida de intestino de bovino).
Conc.	Concentración.

DEPC	Dietil pirocarbonato.
D-MEM	Dubelcco's modified eagle medium (medio mínimo Eagle modificado por Dubelcco).
DNA	Acido desoxirribonucleico.
D.O.	Densidad Óptica.
Ext.	Extracto.
F.D.	Factor de dilución.
HEPES	N-2-hdroxietil piperazina-N'-2- ácido etanensulfónico.
hr.	Horas.
HPV	Human Papilloma Virus (virus del papiloma humano).
L	Litro.
LCR	Long Control Region (región larga de control).
mC	milli Curie.
µg	microgramo.
mg	miligramo.
min	minutos.
µl	microlitro

MPA	Mucophenolic acid (ácido mucofenólico).
MVA	Modified Virus Ankara (virus de la vaccinia modificado de la cepa Ankara)
MVA-E2	Virus de la vaccinia atenuado recombinante.
ONPG	Orto-nitro-phenil-galactosid (orto-nitro-fenil-galactósido).
ORF	Open Reading Frames (marcos de lectura abierta).
pb	Pares de bases.
PCR	Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
pfu	plaque forming units (unidades formadoras de placa).
Prot. Tot.	Proteínas totales.
R.B.	Reactivo de Bradford.
RNA	Ácido ribonucleico.
SFB	Suero Fetal Bovino.
SDS	Dodecil-sulfato de sodio.
SSI	Solución salina isotónica.
TAE	Tris-acetato- EDTA.
TE	Tris-EDTA.

U. β -gal. Unidades de β -galactosidasa.

VV Virus de la vaccinia.

RESUMEN.

Los *Virus de Papiloma Humano* (HPV) son los agentes etiológicos causantes de tumores en la región cérvico-anal, así como de las verrugas entre otras lesiones. El genoma de los HPV aislados de los diferentes tejidos, que han sido secuenciados hasta ahora, muestra una gran homología entre sí. Su genoma contiene genes que codifican para proteínas que alteran el crecimiento normal, de las cuales E6 y E7 son las responsables de la destrucción de los antioncogenes celulares *p53* y *Rb*; además presenta un gen regulador E2, cuyo producto controla la síntesis de RNA de los genes E6 y E7, uniéndose a la región promotora LCR. Dicha unión impide la expresión de los genes E6 y E7.

Se sabe que cuando los HPV infectan las células epiteliales humanas, al integrarse el DNA viral en el genoma celular, ocurre la destrucción del gen E2, ocasionando la expresión de los genes E6 y E7, con la consiguiente formación de tumores.

Por otra parte, dentro de la familia de los *Poxvirus*, el virus de la *vaccinia* (VV) se ha empleado en la vacunación contra la viruela y recientemente se ha utilizado en la elaboración de diferentes vacunas, así como vector de expresión de diferentes genes eucariotas.

Basado en lo anterior, el presente trabajo consiste en la introducción del gen E2 de HPV 18 en el genoma del VV de una cepa conocida como *Modified Virus Ankara* (MVA). Para obtener la cepa recombinante (MVA-E2) se llevó a cabo una recombinación genética *in vivo*, y para ello se utilizó el plásmido **pIII gpt dsP-E2**, el cual contiene el gen E2 de HPV 18 y dos secuencias flancos de VV; este plásmido se transfectó en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), los cuales fueron infectados con la cepa MVA. Después de la purificación de la cepa recombinante MVA-E2, se procedió a la comprobación de la capacidad de esta cepa para expresar la proteína E2 y a su vez, si es capaz de disminuir el crecimiento tumoral inducido por HPV. Para lograr estos objetivos se siguieron dos estrategias:

A) En cultivos celulares. Se utilizaron las células 3T3-F4, las cuales expresan constitutivamente la enzima β -galactosidasa, la cual está bajo el control del

promotor LCR de HPV, estas células fueron infectadas con el virus MVA-E2. Se midieron los niveles de la enzima presentes en los extractos celulares, con el fin de detectar el porcentaje de inhibición del promotor LCR. Así mismo se hicieron experimentos de transfección/infección en células C33 (con plásmidos que contienen los genes reporteros Lac Z -para β -galactosidasa- o CAT -cloranfenicol acetil transferasa- adyacentes a la secuencia de control LCR de HPV), con el mismo fin del experimento anterior. Los resultados obtenidos muestran efectivamente una reducción en la síntesis de enzimas bajo control de la región promotora LCR, en aquellos casos en que las células fueron infectadas con el vector MVA-E2, mientras que el caso contrario se observó cuando se usó la cepa MVA, en donde no hubo reducción de los niveles enzimáticos.

B) En ratones atómicos. Se indujo la formación de tumores mediante la inoculación de células HeLa por vía subcutánea; se trataron tres lotes de ratones de la siguiente manera: al primer lote se le inyectó directamente sobre el tumor solución salina isotónica, al segundo lote de animales se le administró una suspensión de virus MVA en tanto que al tercer lote se le aplicó la cepa MVA-E2, en los tres casos se repitió la administración del respectivo tratamiento una segunda ocasión. En los días subsiguientes al tratamiento se midieron los tamaños tumorales, observándose una disminución en el crecimiento de aquellos que fueron infectados con la cepa recombinante MVA-E2 a diferencia de los otros lotes de animales.

I.- INTRODUCCIÓN.

EL PROBLEMA DEL CÁNCER A NIVEL MUNDIAL.

El cáncer ha llegado a ser el problema de salud más crítico de los países industrializados. Es de esperarse que el 25% de la población de estos países desarrolle la enfermedad en alguna de sus modalidades, de los cuales muchos morirán irremediamente a causa de la misma. En los llamados países del tercer mundo, el problema del cáncer debe sumarse a los problemas de salud ocasionados por la pobreza y la falta de higiene, tales como la desnutrición, las plagas y los trastornos gastrointestinales. Así se adquiere la conciencia de que el cáncer es un problema de salud ubicuo y uno de los de mayores dimensiones dado que día con día cobra más vidas.

Las causas del cáncer son variadas, pero se estima que del 70 al 90% de ellos son ocasionados por agentes hallados en el medio ambiente (Douglas, 1984). Estas estadísticas han hecho que los gobiernos de los diversos países adopten medidas tales como unificar esfuerzos para identificar agentes químicos en el medio ambiente y en los alimentos, etc., y evitar en lo posible su uso, así como el prestar mayor atención a las enfermedades infecciosas, con las cuales se ha podido establecer ciertos vínculos, en algunos de los casos, con el cáncer. También se han hecho esfuerzos encaminados a la detección oportuna del padecimiento, punto crítico en el tratamiento de los pacientes, lanzando campañas masivas de información a la población en general.

Hablar de cifras resulta poco preciso, pues cada día se obtienen nuevos reportes en todo el mundo; sin embargo, las estadísticas aportan una visión

general sobre la distribución de los diferentes tipos de cáncer en las diversas poblaciones. Los factores comunes tomados en cuenta en estas estadísticas son la distribución geográfica, así como la demografía y las características del medio en el cual se desenvuelven (Doll, 1977). Con éstos parámetros se ha establecido que los cánceres predominantes en las naciones industrializadas son aquéllos que afectan al tracto gastrointestinal, encabezados por el cáncer colo-rectal y el de estómago, pero también hay otros tipos predominantes, como lo son el cáncer de pulmón, de seno, de próstata, de endometrio y algunos tipos de leucemias, y por debajo de estos se halla el cáncer de cuello de útero.

En otro contexto, en las sociedades llamadas "pobres" o tercermundistas, las cifras más altas de morbilidad y mortalidad las alcanzan los cánceres cervico-uterinos, de próstata, de seno, de pulmón, y en menores proporciones se encuentran los cánceres orales, faríngeos, de esófago y hepáticos (Berg, 1977).

EL CÁNCER CERVICO-UTERINO EN MÉXICO.

El cáncer cervico-uterino (CaCU) es la enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados. Actualmente se ha incrementado en estos países la frecuencia de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN), que se considera como la lesión precursora del CaCU (Nelson, 1984). En México el cáncer de cérvix es un problema de salud importante, pues 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. En el ámbito latinoamericano, nuestro país ocupa el tercer lugar en la tasa de mortalidad por CaCU según datos de la Dirección General de Epidemiología (Sec. de Salud 1991).

Al parecer las lesiones preinvasoras e invasoras del cuello uterino son parte del mismo padecimiento. Éstas se presentan como una serie de cambios que generalmente empiezan con una lesión bien diferenciada (CIN I o displasia leve), después pasan por una fase menos diferenciada (CIN II o displasia moderada), y luego con una lesión intraepitelial indiferenciada (CIN III, la clásica displasia severa o carcinoma *in situ*), y finalmente terminan en carcinoma invasor (en diversos estadios) cuando las células neoplásicas de epitelio cervical han atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente (Gariglio y García , 1990).

Algunas de las lesiones preinvasoras presentan una regresión y otras tantas permanecen en este estadio durante muchos años e incluso toda la vida y sólo un pequeño porcentaje progresa hacia estadios más avanzados: 75 % de CIN I, 15 % de CIN II y 25 % de CIN III (Reid, 1984). Por lo tanto cuando la lesión se encuentra en forma primaria, no necesariamente progresará a estadios más diferenciados, pero esto depende de cada individuo (en especial de su sistema inmune). El tiempo en que las lesiones progresan de un estadio a otro es muy variable pero se acepta un promedio de 10 a 20 años para llegar de un CIN I a CIN III. La edad de las mujeres que presentan CIN I y carcinoma invasor tampoco es constante, sin embargo se observa que las lesiones predominan entre las edades que van de los 25 a los 50 años respectivamente (Gariglio y García , 1990).

Las observaciones clínicas, así como algunos estudios epidemiológicos, han sugerido la participación de un agente etiológico viral (de transmisión sexual) en el desarrollo del CaCU (Zur Hausen, 1980). Los principales candidatos asociados a CaCU fueron los *Virus del Herpes Simple tipo II*, y recientemente se involucró al *Papilomavirus Humano* (HPV) (Zur Hausen, 1987). Pero es hasta

ahora cuando se sabe que el agente etiológico más frecuentemente aislado en las lesiones de CaCU son los HPV's (Cornelissen, 1992).

En la actualidad se trata de contrarrestar al avance de la enfermedad por medio de campañas masivas de información para prevención y detección temprana, así como con el uso de terapias, en los casos en los cuales el transtorno se encuentra en estados más avanzados, por ejemplo, la quimioterapia, cirugía y más recientemente se ha comenzado a dirigir la mirada hacia la terapia génica, dado que los conocimientos sobre genética, biología molecular y bioquímica están teniendo un crecimiento considerable en los últimos años.

MARCO TEÓRICO.

GENÉTICA DEL CÁNCER.

Según Knudson, el cáncer es una denominación común para cerca de 200 enfermedades que se caracterizan por el crecimiento anormal de las células. El que las células lleguen o no a una transformación maligna y eventualmente al desarrollo del cáncer está condicionado por muchos factores: la susceptibilidad de las células, la exposición a carcinógenos químicos (Cowdry, 1965) y la intervención de numerosos factores que puedan modificar el DNA, como lo son las radiaciones y ciertos tipos de virus como los Retrovirus (virus de RNA), los Virus de la Hepatitis B, los virus de Epstein Barr, los Virus Linfotrópicos y el Papilomavirus Humano (virus de DNA) (Zur Hausen, 1991).

Muchos agentes interactúan con el DNA de la células. Cuando esta interacción afecta al DNA de las células germinales ocasiona mutaciones deletéreas, que son acarreadas por las futuras generaciones; si se afecta el DNA de las células somáticas durante el desarrollo embrionario, los daños

aparecen como defectos en el nacimiento y cuando se afectan las células somáticas en un organismo adulto, puede provocarse el desarrollo de cáncer. (Cairns, 1978).

La teoría génica del cáncer propone en principio, que los cromosomas celulares contienen en forma natural genes carcinogénicos en estado de latencia, es decir, que no se expresan debido a cierto tipo de control negativo que reprime su transcripción. Sin embargo, una vez activados se convierten en productos proteínicos que ocasionan que se desestabilice el ciclo celular normal y se des controle el crecimiento y diferenciación de las células llevándolas así a la transformación de las células normales en cancerosas (Weinberg, 1985). Se ha demostrado que algunos virus (por ejemplo los retrovirus) acarrean en su genoma oncogenes que son responsables de la inducción al cáncer. En 1975 los trabajos de J. Michel Bishop y Harold E. Varmus, mostraron que los oncogenes virales tienen un origen celular, por ello éstos últimos son *proto-oncogenes* (Weinberg 1985; Hunter 1990; Bishop 1982, 1987). Con lo cual se sugirió que los virus oncogénicos adquirieron el oncogén del hospedero durante infecciones previas (Bishop, 1982).

Los planteamientos que se han hecho para poder descifrar la manera en que interviene los oncogenes en el desarrollo del cáncer incluyen varias posibilidades: PRIMERA, en el caso de ciertos virus (por ejemplo los Retrovirus) la expresión del oncogén que acompaña al virus incrementará la concentración intracelular de la proteína oncogénica viral (Bishop, 1982). SEGUNDA, la activación no viral de un oncogén celular latente puede deberse a una mutación en la región de control de la transcripción de un oncogén celular, la cual lo enciende, o a una mutación en el propio oncogén, lo que da por resultado un producto antioncogénico alterado pero con mucho mayor actividad oncogénica (Weinberg, 1984). TERCERA, puede ocurrir una activación no viral debida a

ciertos desplazamiento (transposición) de un oncogén hacia una posición diferente en el cromosoma, donde queda bajo la influencia de una señal de control positivo muy intensa, como la de un elemento intensificador de la transcripción; por ejemplo, en la activación del proto-oncogén *c-myc*, el cual se separa de su posición original en el extremo final de un cromosoma y se transpone en el extremo final de un cromosoma diferente; entonces queda yuxtapuesto con genes responsables de la síntesis de inmunoglobulinas (anticuerpos). La asociación de proto-oncogenes con un gen de inmunoglobulina aparentemente desregula el proto-oncogén y ello le imparte una nueva función biológica (Weinberg, 1984). CUARTA, la activación no viral puede tener por causa una amplificación génica, es decir un mayor número de copias del oncogén debida a la replicación local del DNA (Weinberg, 1985). QUINTA, en algunos cánceres virales, por ejemplo en los producidos por Papilomavirus, SV 40 y algunos Adenovirus, los virus codifican oncogenes y sus productos para estimular el crecimiento y división celulares, así la replicación viral óptima ocurre en el crecimiento activo de las células, con lo cual el virus produce (por medio de los oncogenes) productos que interactúan sobre los dos productos de los genes supresores *Rb* y *p53* (Levine, 1992).

ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMOR.

Los genes cancerígenos han sido descubiertos en el genoma de células tumorales. Estos genes, frecuentemente llamados oncogenes, representan la fuerza directriz del comienzo del crecimiento incontrolado de muchas células cancerosas (Weinberg, 1985).

Los oncogenes son versiones alteradas de genes ordinariamente benignos presentes en las células normales. Del total del genoma humano (algo así como 30,000 genes), tal vez poco menos de 100 sean oncogenes (Hunter, 1984).

Ya se identificó el tipo de función proteínica de alrededor de la mitad de los oncogenes conocidos. Siete de los oncogenes (*src, ros, yes, fgr, abl* y *ras*) codifican proteínas que tienen actividad de cinasa de las proteínas y todos con excepción de *ras*, son específicos para la tirosina (Krontiris, 1995). Esta función parece ser la clase principal entre las proteínas oncogénicas (Hunter, 1984). Ligar un oncogén a un factor de crecimiento tiene obvias interferencias en cuanto a la explicación de por qué una célula saludable pierde el control en su crecimiento normal. En el momento inoportuno la célula se ve bombardeada con cantidades excesivas de una sustancia que estimula el crecimiento y la división celulares, o ambos fenómenos. Hay otros tipos de oncogenes que no precisamente son factores de crecimiento, pero sin embargo actúan como receptores de éstos (por ejemplo el oncogén *erb-B*). Otras tres proteínas oncogénicas se unen con fuerza al GTP (proteínas G), Y aún no se aclara como causan la transformación estas proteínas G. Dentro de las posibilidades se sugiere la fijación del GTP (y subsecuentemente la hidrólisis de éste a GDP) para activar la proteína oncogénica a fin de que realice alguna otra función que pudiera tener. Otra posibilidad es que la proteína G codificada por el oncogén estimule la acción de una o más proteínas G normales, algunas de las cuales regulan según se sabe procesos celulares clave (Weinberg, 1985; Hunter, 1990).

También se ha demostrado que cierta proteína oncogénica que actúa en el núcleo de las células tiene una fuerte actividad de fijación al DNA. Este fenómeno podría dar por resultado la activación de un gen de transformación celular que por lo general está reprimido (Weinberg, 1985). A este respecto, se conoce ahora que la regulación en la expresión de las proteínas oncogénicas está dada por un mecanismo de regulación negativa, en el cual intervienen los genes supresores de tumor o antioncogenes.

A pesar de que la existencia de los genes supresores de tumor se postuló en 1971, hace menos de 10 años que se sabe su modo de acción e identidad. La existencia de los genes supresores ha dispuesto un claro entendimiento de la predisposición hereditaria al cáncer, de cánceres en células o tejidos específicos, de la alteración del cariotipo en células cancerosas y nuevos conceptos en la regulación del ciclo celular (Krontiris, 1995).

El concepto de que uno o más productos de los genes supresores pueden suprimir o inhibir el crecimiento de las células tumorales, deriva de los primeros experimentos en células somáticas. Una célula normal fusionada en cultivo con una célula habilitada para producir tumores en animales crece bien en cultivos celulares (resultando un hibridoma), pero no produce tumores en animales (independientemente del origen tumorogénico de la célula -viral, químico o por mutación espontánea y de la línea celular-). En algunos casos en donde hubo reacción tumoral en animales se demostró que había asociación del tumor con un cromosoma específico derivado de los padres no tumorogénicos (Levine, 1992). Estos experimentos demostraron que hay muchos locus involucrados en la supresión del crecimiento tumoral. En los últimos 15 años se ha trabajado en pruebas que detectan esto en tumores humanos, por ejemplo: una delección en el cromosoma 11p y 13q están comúnmente asociados a cáncer de pecho; una delección de 3p, 13q y 17p en cáncer de pulmón; y 5q, 17p, 18q y 22q, son relacionados con cánceres colorectales (Levine, 1992).

Como se mencionó, hay cánceres virales en los cuales los virus codifican oncogenes, que interactúan con los productos de los genes supresores *p53* y *Rb*, interfiriendo de esta manera con el crecimiento y división celular.

Hay una gran variedad de mecanismos por medio de los cuales los productos de los genes supresores regulan negativamente el crecimiento y división celulares (Levine, 1992).

Los elementos genéticos llamados genes supresores de tumor, pueden ser activados en alguna modalidad, por ejemplo, por delección, mutación puntual o metilación, ocasionando que la célula se transforme en una célula maligna. Algunos genes supresores de tumor han sido identificados y su función específica dentro de la célula se muestra en la siguiente tabla (Levine, 1992):

TABLA 1

GEN SUPRESOR	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	POSIBLE FUNCIÓN
Rb	13 q 14	factor de transcripción
p53	17 p 13	factor de transcripción
WT 1	11 p 13	factor de transcripción
NF 1	17 q 11	relacionado con GAP.
DCC	18 q 21	adhesión -comunicación
MCC	5 q 21	activación de prot G.
PTp	3 p 21	fosfatasa-tirosincinasa.

Al menos 2 genes supresores de tumor, llamados *p53* y *Rb*, se han encontrado alterados (deletados, rearreglados o mutados) en muchos diferentes tipos de cáncer, sugiriendo aberraciones de posibles rutas comunes del control del crecimiento en estas diversas malignidades (Levine, 1992).

El gen de retinoblastoma (*Rb*) fué el primero clonado por Friend y cols. en 1986 (Weinberg, 1989). Este gen está constituido de 27 exones dispersados en aproximadamente 200 Kb del DNA genómico (Huang, 1988). Su transcrito de mRNA de 4.7 Kb codifica para una proteína de unos 110 KDa, la cual funcionalmente tiene importancia en la fosforilación de los estados

postraduccionales del RNA (Lee, 1987). Este gen se ha encontrado expresado virtualmente en todos los tejidos. Su estado de fosforilación varía a través del ciclo celular, siendo la máxima fosforilación en la fase S y la reducción de la fosforilación después de la fase M (Buchkovich, 1990). Estas observaciones sugieren que *Rb* actúa en el ciclo celular en una modalidad especial y que la oscilación de estados de fosforilación-desfosforilación puede ser el principal mecanismo en el control en el ciclo celular. Una particular e intrigante propiedad de la proteína *Rb* es la propensión a formar complejos con las proteína productos de los genes transformantes de virus tumorigénicos de DNA, incluyendo al antígeno T de SV40 (De Caprio, 1988), la proteína E1A de adenovirus (Whyte, 1987) y la proteína E7 de Papilomavirus Humano (Dyson, 1989a, 1989b). Esta propiedad de formar complejos con proteínas relacionadas con la transformación tumoral de virus de DNA es también mostrada por la proteína codificada por el gen *p53* (Levine, 1992).

El gen *p53* ha sido implicado en muchas formas de cáncer humano, tanto esporádicas como hereditarias. El producto del gen *p53* actúa de manera similar a la proteína *Rb*, regulando negativamente el crecimiento celular; se localiza en el núcleo, y como ya se mencionó, al igual que la proteína *Rb* se une a varias oncoproteínas virales formando complejos, tales como el antígeno T de SV40, la proteína E1B de Adenovirus y la proteína E6 de HPV (Sarnow, 1982). La proteína E6 de HPV se une a la proteína *p53* y promueve la proteólisis de la misma (Levine, 1992).

LOS PAPILOMAVIRUS HUMANOS.

El cáncer cervical es uno de los más comunes trastornos malignos en las mujeres de todo el mundo. Un factor que al parecer juega un papel importante en el desarrollo de este tipo de cáncer es la infección con ciertos tipos de

Papilomavirus Humanos (HPV), incluidos los tipos 14, 16, 18, 20, 21, 23, 25, 31, 33, 35 y 45. En contraste, otros tipos de HPV que también infectan el tracto ano-genital, tales como los tipos 6, 11, 42, 43 y 44, no son asociados con el cáncer de cérvix (Cullen, 1993).

Hay una clara evidencia de que el DNA de los HPV 16 y 18 es mantenido en forma episomal en las infecciones productivas benignas (Cullen, 1993); en contraste, el DNA de los mismos HPV ha sido frecuentemente identificado en especímenes de biopsias de cánceres de cérvix, en líneas celulares aisladas de neoplasias cervicales y en queratinocitos humanos inmortalizados. La integración usualmente destruye los marcos de lectura abierta (ORF's) de E1 y E2, permitiendo potencialmente la desregulación de la expresión viral (García, 1990); estas observaciones sugieren la atractiva hipótesis de que la pérdida del represor E2 permite la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales pueden promover el desarrollo de neoplasia (Cullen, 1993). Se ha observado que muchos cánceres contienen HPV 18 y consistentemente no expresan transcritos del gen E2 aunque continúan expresando E6, E7 y E1. En contraste, muchos cánceres que contienen HPV 16 expresan la región temprana completa. La implicación que tiene esta observación es que la integración de HPV 18 por la región E2 sucede con la pérdida de todas las moléculas episomales, perdiendo a su vez, el marco de lectura abierta de E2, de éste modo puede ser que la secuencia de DNA de HPV 18 de alguna manera ayuda al evento de integración resultando en un DNA de HPV integrado cuyos promotores (LCR) llevan a una rápida y agresiva progresión a la malignización (Cullen, 1993).

En el humano se han descrito tres tipos básicos de infección por Papilomas: la verruga común (*verruca vulgaris*), la verruga plana (*verruca plana*) y el

condiloma tipo verruga (*condiloma acuminado*) (Zur Hausen 1986; Orth, 1977).

Las verrugas comunes se caracterizan por varios grados de hiperplasia papilar y una superficie verrucosa dura. Las verrugas plantares y palmares son variantes topográficas de las verrugas vulgares. Las verrugas planas representan epidermis sin hiperplasia papilar. Ellas contienen numerosas células claras con lo cual reemplazan, en parte, el estrato espinoso y granuloso. Estas células parecen el resultado de un proceso primario de vacuolización arrancando del área perinuclear (Orth, 1977).

Los condilomas acuminados (verrugas genitales) son caracterizados por un exuberante crecimiento con una pequeña queratinización o no. Ello ocurre predominantemente en la región genital pero ocasionalmente también se observa en otros sitios (mucosa oral, región periumbilical). (Orth, 1977). En la tabla 2 se da un resumen de las principales características de las lesiones asociadas a papilomas.

Taxonomía.

Los Papilomavirus representan un grupo de virus de DNA altamente especializados, conteniendo miembros con una notable especificidad de hospedero (Orth, 1977; Zur Hausen, 1986). Entre los miembros de la familia se encuentran los Papilomavirus que infectan al conejo cola de algodón, los virus de fibropapiloma de bovino y los que infectan el tracto alimentario de los bovinos, los cuales han demostrado un alto potencial oncogénico (Orth, 1977).

Los HPV han sido identificados en un número de especies animales tales como en caballos, perros, monos, conejos, hamsters, etc. Sin embargo no se ha observado una recombinación entre los diferentes tipos, por lo tanto tampoco existe una importante reacción cruzada serológica entre los diferentes

grupos, lo cual demuestra el alto grado de especificidad de hospedero así como de los tejidos (Orth, 1977).

El modo exacto de transmisión no es muy claro para muchas infecciones de Papilomavirus. Los microtraumas parecen jugar un papel muy importante como lo indica la aparición de verrugas en rasguños. El período de latencia de desarrollo de la verruga parece que requiere entre 3 y 12 meses para HPV.

El condiloma acuminado frecuentemente ocurre en los sitios de la vulva, vagina y pene, y excepcionalmente en la uretra, vejiga y ureteres (Zur Hausen, 1987).

Los Papilomavirus tienen cerca de 55 nm de diámetro determinado por microscopía electrónica. No contienen lípidos y por tanto no son inactivados por solventes lipídicos. La partícula icosaédrica contiene 72 capsómeros, y se clasifican en la familia de los *Papovavirus* subgrupo A (Fenner, 1970).

TABLA 2.

TIPOS CLÍNICOS	CONTENIDO VIRAL	DISTRIBUCIÓN	TRANSMICIÓN	FACTOR DE RIESGO	MALIGNIZACIÓN
Verrugas en la piel	Variable usualmente(alto)	niños y adultos	contacto directo o indirecto através de abrasión.	comunidad, deficiencia inmune	no reportada (usual regresión)
Epidermodisplasia verruciforme	moderado	crecimiento a lo largo de la vida	desconocida	factores genéticos	frecuente (no hay regresión)
Condiloma acuminado (anales y genitales)	bajo	adultos jóvenes	venerea	promiscuidad, higiene pobre, embarazo.	rara (vulva, pene y ano)
Hiperplasia oral-epitelial	moderado	en todas las edades	desconocida	factores genéticos	no reportada..
Papilomatosis larigeo juvenil	extremadamente bajo.	infantes y niños, adultos.	desconocida	madres con condiloma presencia de verrugas	rara (por lesiones recurrentes o persistentes)

(Tomado de Orth, 1977)

Biología Molecular de HPV

Las partículas virales contienen sólo DNA y proteínas. El DNA de doble cadena es circular y contiene 8,000 pb aproximadamente. En los genomas de HPV se han identificado ORF's organizados en regiones de expresión temprana (E) y tardía (L) (figura 1). Los primeros codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), la transcripción (E2), y transformación celular (E6 y E7), los segundos codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2).

El genoma viral contiene una región larga de control (LCR) de aproximadamente 1 Kb sin ningún ORF importante, en la que se ha identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de la replicación. Como puede observarse en la figura 1, la información codificada se encuentra localizada en una sola de las cadenas del DNA y los ORF's tiene la misma orientación transcripcional, con sobreposición de alguno de ellos (García y Gariglio, 1990).

Los elementos regulatorios de la expresión de los genes E6 y E7 se encuentran localizados en el LCR. Los sitios de unión de la proteína E2 se encuentran localizados de una manera particular en el LCR de los tipos genitales; estos LCR representan un doble sitio perfecto de unión justo arriba de la caja TATA (figura 2). En otros tipos humanos y animales, el sitio de unión más cercano al promotor E6 proximal está a 140 pb de la caja TATA (García y Gariglio, 1990).

Proteína E2.

El producto del gen E2 (ORF E2) es un transregulador de la transcripción temprana (E6 y E7), que se une al DNA pues reconoce específicamente la secuencia palindrómica ACC-CNNNNN-GGT a la cual se une en forma de

dímero (figura 3). Dicha secuencia se encuentra repetida varias veces en el LCR de todos los HPV secuenciados hasta ahora.

Se ha observado que las células transformadas por Papiloma Virus Bovino tipo 1 (PVB 1) expresan, además del producto completo, dos proteínas E2 truncadas. Se ha observado que mientras que VPB estimula la expresión de E6 y E7, en HPV se reprime la misma; de esta manera la localización de los sitios E2 determina si se activa o reprime la expresión de los genes E6 y E7 (García y Gariglio, 1990).

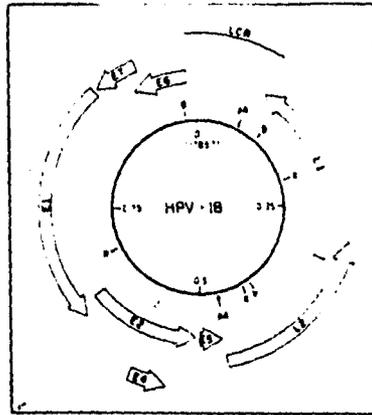


FIGURA 1. MAPA GENETICO DE HPV 18
(Tomado de García y Gariglio, 1990)

Proteínas E6 y E7.

Los productos de los genes E6 y E7 han sido implicados en la inducción y el mantenimiento del estado transformado en aquellas células que contienen secuencias de HPV. A diferencia de lo que ocurre con los genes E1 y E2, los genes E6 y E7 no se destruyen cuando se integra al genoma celular el DNA viral; dichos genes se expresan selectivamente en tumores genitales y líneas celulares derivadas de tumores humanos (García y Gariglio, 1990).

La proteína E6 se ha encontrado tanto en el núcleo como en la membrana plasmática de las células infectadas por HPV, y se sabe que es muy afín al DNA. En tanto la proteína E7 es una fosfoproteína que se encuentra en el citoplasma celular, y aún permanece desconocida su función (García y Gariglio, 1990). Ambas proteínas juegan un papel muy importante en el mantenimiento del estado transformado, pues le son necesarias al HPV para llevar a cabo su replicación, ya que esta sólo se da en la etapa de división celular y ambas proteínas inducen un estado de permanente división celular, ya que la proteína E7 forma un complejo insoluble con la proteína antioncogénica celular *Rb*, en tanto que el gen E6 produce una proteína que tiene actividad de proteasa sobre la proteína *p53*, de esta manera los niveles de las proteínas E6 y E7 determinan el estado transformado del tumor (Levine, 1992).

Especificidad tisular.

Los HPV infectan solamente células del epitelio que pueden dividirse (células basales); en estas células, el virus no puede replicarse y por tanto permanece en estado latente. A medida que las células epiteliales se diferencian, el DNA se replica, se transcribe y consecuentemente forma los viriones completos. Estas observaciones han sugerido que hay algunos factores proteínicos en las células que participan en la regulación del ciclo viral, durante los diferentes estados de la diferenciación de los epitelios.

A medida que la diferenciación progresa, las células se vuelven cada vez más permisivas a la replicación viral. Ésta puede observarse en las capas suprabasales, mientras que las proteínas estructurales y las partículas virales aparecen sólo en las capas superiores (García y Gariglio, 1990).

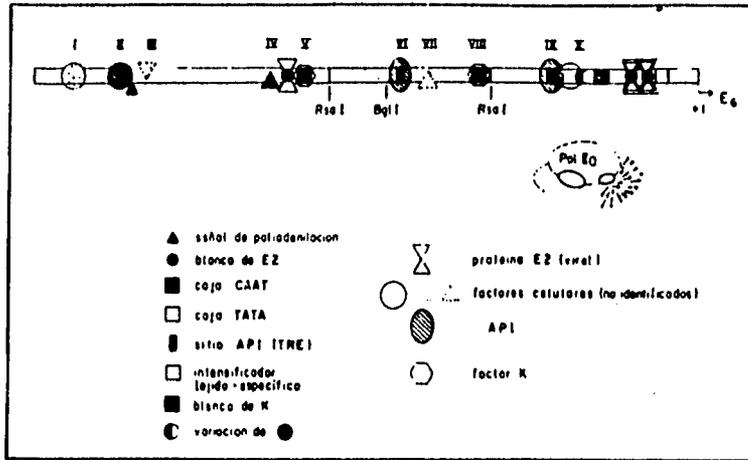


FIGURA 2 REGION PROMOTORA LCR (Tomado de García y Gariglio, 1990).

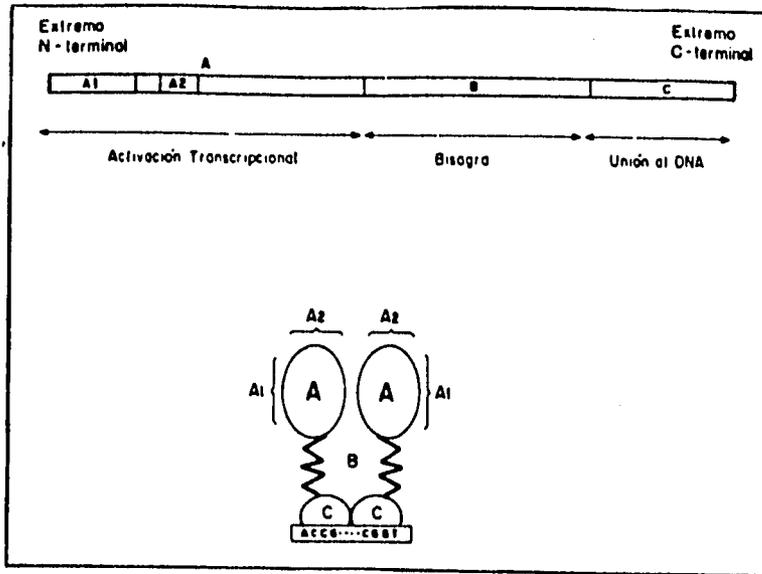


FIGURA 3 PROTEINA E2 (Tomado de García y Gariglio, 1990).

Posibles mecanismos de transformación celular por HPV

Se sabe que los HPV 6, 11, 16 y 18 se encuentran en forma episomal y productiva en las lesiones benignas y precancerosas y que generalmente están amplificados en unas 50-200 copias por célula (García, 1990). Esto parece indicar que la integración de los tipos 16 y 18 está relacionada con el proceso de malignización de las células normales o en otras palabras, de la formación de tumores. Ya es sabido que para que se lleve a cabo la integración del genoma viral en el genoma celular ocurre la ruptura de los genes E1 y E2. Los sitios en los que se puede insertar el DNA viral son muy variados, y hasta donde se sabe no hay un patrón característico (García y Gariglio, 1990).

Resulta interesante la observación que se hace al respecto de que no todas la infecciones por HPV genitales inducen una transformación maligna, entonces se postula la falla de los mecanismos celulares que controlan la expresión de los genes virales persistentes, y además la coparticipación de otros agentes no virales que lesionen al DNA celular (por ejemplo, metabolitos mutagénicos del cigarro así como los que se encuentran en el medio ambiente-polución-, e inflamaciones crónicas de los genitales), y agentes virales y parásitos relacionados (por ejemplo: virus del herpes, tricomonas, clamidias, etc), así como la interacción de proteínas celulares con las virales (como TEF-1 y su coactivador) (Ishiji, 1993). El gran período de latencia que transcurre entre una lesión precursora y su progreso a carcinoma sugieren la participación de factores del hospedero (por ejemplo: respuesta inmune, hormonas, etc) que vuelven impredecible el diagnóstico de una lesión precursora (García y Gariglio, 1990).

VECTORES DE CLONACIÓN COMO CLAVE DE LA TERAPIA GÉNICA.

Durante la última década, los virus han sido objeto de intensos estudios que han logrado precisar un hecho esencial: los virus sólo se reproducen hasta que han penetrado la célula que van a parasitar. De allí surgió la idea de utilizarlos como vectores, es decir como misiles dirigidos, mediante las inmensas posibilidades que ofrece la terapia genética. A muy grandes rasgos, esta podría resumirse de la siguiente manera: se ha comprobado que numerosas enfermedades son causadas por la desaparición o ineficiencia innata (hereditaria) o adquirida (patológica) de uno o varios elementos del código de los sistemas metabólicos o de defensa de la célula. La terapia consiste entonces, en transferir el fragmento del material genético ausente o deficiente, al interior de los cromosomas de las células que forman los tejidos enfermos (Estrada, 1992).

La elección del virus-vector que porte el gen ha sido objeto de numerosas investigaciones. Los diferentes equipos de trabajo a lo ancho de todo el mundo se han inclinado principalmente por los retrovirus, adenovirus y virus de la vaccinia. En todos los casos las características que deberán cubrir los virus para ser utilizados como vectores son: 1) ser incorporados eficientemente en el huésped adecuado; 2) replicarse con alto número de copias; 3) ser transcrito eficientemente; 4) ser traducido también con eficiencia (Brook, 1987).

El virus de la Vaccinia como vector de clonación.

La idea de usar al virus de la vaccinia (V V) como vector no es nueva y fué planteada por Mackett y col. en 1982 (Mackett y Moss, 1982). Hacia fines del siglo XVIII los trabajos de Jenner establecieron que los virus aislados de vacas y caballos protegían a los humanos de la infección por el virus de la viruela. Este efecto protector es el resultado de la gran semejanza genética entre los

miembros de la familia de los *Orthopoxvirus*, donde se encuentran el virus de la viruela y sus parientes más benignos los de la viruela de la vaca y del caballo (Pizarro, 1992).

El virus vacunal que utilizó Jenner originalmente, difiere del actualmente disponible para ese propósito y este virus tampoco es muy similar al de la viruela, por lo cual se llama *virus de la vaccinia* o virus vaccinia; no se le encuentra en la naturaleza, y se trata de un agente de laboratorio que se desarrolla en la piel del humano, del ganado vacuno y del conejo, además de la membrana corioalantoidea de huevos embrionados y en cultivos de tejidos. (Pizarro, 1992). Su origen es motivo de discusión, ya que puede tratarse de una variante del virus de la viruela, del de la vacuna o bien, un recombinante de ambos; sin embargo, aunque el esquema genético del virus de la vaccinia es similar al los dos anteriores, muestra diferencias suficientes para considerarse como una entidad distinta (Mackett y Archard, 1979).

El V V se puede producir a bajo costo, es termoestable, resistente a la liofilización, relativamente seguro, su administración es muy sencilla y confiere una inmunidad muy prolongada (Estrada, 1992)

Al desaparecer la viruela, la necesidad de producir el V V disminuyó, sin embargo se han desarrollado métodos para construir V V modificados por ingeniería genética que funcionan como vectores de expresión de genes de otros agentes infecciosos así como de genes eucariotas. Estos vectores ya han sido probados exitosamente como vacunas activas, así como para producir respuesta celular y anticuerpos, y es ahora cuando comienza su etapa como agente terapéutico.

Para insertar genes foráneos en el virus, el primer paso involucra aislar el gen que interesa y clonarlo en algún plásmido. Además, adyacentes se insertan secuencias específicas del V V, de 100 a 10,000 pares de bases (pb), las

cuales juegan un papel vital ya que orientan precisamente al gen foráneo a las secuencias homólogas en el genoma del vector. El plásmido recombinante con el inserto quimérico es usado para transformar células en cultivo y simultáneamente las células se infectan con el V V activo. Este virus que se conoce como de rescate, entra al citoplasma, procede con su ciclo y durante la replicación, el DNA del virus infectante se acerca al DNA del plásmido recombinante. Debido a la complementariedad entre las secuencias homólogas del V V, contenidas en el plásmido, y en el genoma viral, ambas se alinean y por recombinación *in vivo* el genoma viral "rescata" al gen foráneo, incorporándolo en su propio DNA. Después la replicación continúa, seguida de la maduración y liberación de los nuevos virus recombinantes (Estrada, 1992).

Aquí es importante hacer notar varios puntos. Primero, el gen foráneo debe encontrarse dentro de secuencias propias del V V, para que al recombinarse con el genoma viral no interrumpa su funciones esenciales. Segundo, las secuencias de vaccinia 5' adyacentes al inserto foráneo deben tener promotores del virus o señales promotoras transcripcionales modificadas, de tal forma que la RNA polimerasa viral pueda también reconocer y transcribir al gen foráneo. Finalmente, la recombinación *in vivo* se lleva a cabo con una frecuencia del 0.1% aproximadamente, siendo este nivel suficiente para la detección de virus recombinante mediante técnicas de hibridación de DNA. De esta forma se han podido insertar segmentos de hasta 25,000 pb (Smith y Moss, 1983). En general la máxima expresión se obtiene usando los promotores asociados con genes del virus que codifican para las proteínas estructurales principales. También se han usado promotores sintéticos, cuya actividad se ha mejorado mediante mutaciones. Para garantizar la expresión de genes foráneos se recomienda el uso de marcos de lectura abierta, ya que el procesamiento de los transcritos no ocurre en el citoplasma (Estrada, 1992).

Hasta el momento se han podido expresar en este sistema genes foráneos provenientes de virus y células procarióticas y eucarióticas. Los factores que han contribuido incluyen que la expresión se efectúe en el citoplasma y el uso de factores de transcripción del V V (Estrada, 1992).

El V V usado como vector representa ventajas tales como retener la infectividad, tener un amplio rango de hospedero, relativamente altos niveles de síntesis de proteínas y un transporte apropiado, procesamiento y modificaciones transduccionales de las proteínas expresadas, además de una alta inmunogenicidad y una alta seguridad en su uso (Estrada, 1992).

Taxonomía.

La familia *Poxviridae* se divide en 6 géneros en base a sus diferencias antigénicas y morfológicas. Tanto el virus de la vaccinia como el de la viruela pertenecen al género de los *Poxvirus*, el cual contiene a los virus más grandes y complejos. Los poxvirus causan infecciones en el hombre tales como la viruela, el molusco contagioso, viruela bovina, nódulos de los ordeñadores y la estomatitis ulcerosa ovina (Fenner, 1970). Estos virus son lo suficientemente grandes como para poderse observar bajo el microscopio de luz utilizando una mínima iluminación. El virión del virus de la viruela es idéntico al de la vaccinia. Su nucleocápside rompe con los esquemas conocidos para otros tipos de virus, por lo cual adopta el nombre de virión "complejo". Contiene una membrana "externa" con subunidades de lipoproteínas de forma tubular distribuidas de forma irregular que es adquirida cuando el virus sale de la célula, que encierra un centro y dos "cuerpos laterales", cuya naturaleza aún permanece incierta. En el centro se encuentra casi todo el material genético (Fenner, 1970). Green y sus colaboradores (1942) describen al virus con forma de "ladrillo". Tiene una estructura química compleja con proteínas, ácido nucleico (DNA),

fosfolípidos, grasas neutras y carbohidratos. Los antígenos LS y NP constituyen una porción importante de la superficie de los cuerpos elementales. También tiene una hemaglutinina que es solamente activa en eritrocitos de algunas aves (Rivers, 1965). En el citoplasma de las células infectadas se forman estructuras de inclusión muy típicas, conocidas como cuerpos de Guarnieri (Moss, 1985).

Ciclo de replicación del virus de la vaccinia.

Los eventos que conforman el ciclo replicativo de los poxvirus, incluyen la entrada del virus, la regulación en la expresión de los genes, la replicación del DNA, el ensamble de las partículas virales y la diseminación del virus.

La entrada del virus de la vaccinia a la célula hospedero está dada por una fusión entre las membranas de cobertura del virus y de la célula. Inmediatamente ocurre un desenvolvimiento del virión en el citoplasma. El siguiente proceso conocido como segunda etapa de descubierta, comienza después de un período lag de 0.5 a 2.0 horas, dependiendo de la multiplicidad de infección. La replicación del DNA comienza con unas pocas horas de infección, requiere la síntesis de enzimas codificadas por el mismo virus incluyendo una DNA polimerasa. La replicación marca el final de la primera fase de la expresión de los genes y el comienzo de la segunda fase. Después que se han transcrito los genes intermedios, comienza la expresión de los genes tardíos, muchos de los cuales codifican para proteínas estructurales. Finalmente la progenie de viriones es ensamblada en un complejo proceso de morfogénesis (Garcés J, 1993).

Biología molecular del V.V.

El virus de la vaccinia al igual que el resto de los poxvirus, codifica para su propio sistema de transcripción. Este incluye una RNA polimerasa, factores de transcripción, la polimerasa poli (A) y enzimas para la adición de la secuencia terminal de poli (A) y para metilación. Las secuencias promotoras en el DNA reconocidas por este sistema de transcripción son únicas, de aquí que para lograr la expresión del gen foráneo es indispensable el uso de promotores de vaccinia (Estrada G, 1992). La transcripción de los genes de vaccinia se regula temporalmente; los genes virales están agrupados en tres clases, tempranos, intermedios y tardíos, de acuerdo a la etapa de infección en la cual ellos son activados (Baldick, 1993). La mayoría de los genes esenciales se localizan en la región central del genoma, en una forma muy conservada en los poxvirus; los genes que no son esenciales para la replicación en cultivos celulares, entre los cuales se cuentan los genes del rango de hospedero, se encuentran cerca de los extremos finales. La aparente ausencia de intrones, las cortas secuencias de los promotores y los relativamente tamaños pequeños de los marcos de lectura abierta (ORF's) cuentan para que el genoma se empaquete en unos 150 a 200 genes en la molécula del DNA de 185,000 pb. Ambas cadenas del DNA son transcritas. Aunque todas las enzimas involucradas con la transcripción están localizadas en el centro, cuatro proteínas estructurales cuentan alrededor del 70% de la masa. En lugar de histonas, muchas proteínas virales son fuertemente unidas al DNA y aparentemente esto ayuda a mantener a éste en forma de una superhélice (Moss, 1990).

Hasta ahora se han involucrado tres genes en la determinación del rango de hospedero en el virus de la vaccinia: K1L, C7L y un gen que codifica una proteína de 77 KDa. Los genes K1L y 77 KDa codifican proteínas con repeticiones parecidas a la ankirina eritrocitaria, comunes a proteínas

eucariotas tan diversas como factores de transcripción, receptores de membrana y reguladores del ciclo celular (Sutter, 1994).

El sistema de transcripción es activado por un evento en cascada, el cual involucra el reordenamiento en cis y trans-activación de factores de transcripción lo cual lleva a la expresión sucesiva de genes (Moss, 1990). Sin embargo hay algunas secuencias promotoras de genes tempranos y de genes tardíos con arreglos en tándem, de esta manera la expresión de éstos se dá através del ciclo de crecimiento. La clase de genes llamada intermedios son expresados post-replicativamente, y de igual manera requieren de ciertos factores de transcripción intermedia (Moss, 1990).

La transición entre las fases consecutivas de la expresión genética está mediada por factores de transcripción específicos, los cuales son codificados por genes de la clase precedente.

Así después de la entrada a la célula, un sistema completo de transcripción que entra en la partícula viral, produce los primeros mRNA. Este sistema incluye una multisubunidad de polimerasa de RNA dependiente del DNA, un factor de transcripción temprana (VETF-1) heterodimérico y enzimas para el "casqueteado" y poliadenilación de los transcritos tempranos, así como un factor de terminación (que dá la señal de terminación cuando los templados tienen la secuencia TTTTNT), una trifosfatasa de nucleósidos dependiente del DNA y una topoisomerasa (Moss, 1990). Así la activación y decline de la transcripción temprana puede corresponder con la primera y segunda etapas de desenvolvimiento, respectivamente. Estudios de hibridación demuestran que cerca de una mitad del genoma es transcrito antes de proceder a la replicación del DNA.

La existencia de dos clases de genes se conoció desde hace algún tiempo, sin embargo, recientemente se describió una nueva clase de genes, que se

expresan antes de que se realice la replicación del DNA viral, y sin embargo no pertenecen a la clase de genes tempranos (como lo indicó la diferencia entre sus promotores). Los productos de la traducción de los mRNA's tempranos incluyen enzimas y factores para la replicación y la expresión de los genes intermedios, para cuya expresión se requiere de una polimerasa, una enzima de "casqueteado" de RNA naciente y un mínimo de un factor de transcripción. Inmediatamente después de la replicación las mRNA's intermedios son elaborados. Sus productos de traducción incluyen los trans-activadores de los genes tardíos, cuyos mRNA's codifican proteínas del virión, incluyendo las 2 subunidades del VETF-1, la enzima polimerasa y las enzimas necesarias para el procesamiento de los mRNA's tempranos. Para que la transcripción tardía se lleve a cabo, se requiere de una enzima polimerasa y del factor de transcripción tardía (VLTF-1) (Rosales, 1994). Estos datos son consistentes con un ciclo en cascada (tempranos-intermedios-tardíos-tempranos) (Kovacs, 1994).

El inconveniente que presenta el virus al utilizarse como cepa silvestre, ya sea en forma de vacuna o en calidad de vector de clonación, es la gran facilidad que tiene para recombinarse dentro de una célula infectada con otros miembros de los poxvirus, lo cual puede resultar contraproducente, ya que pudiera adquirir nuevas características de patogenicidad. Para evitar este riesgo, se ha pensado en la utilización de una cepa altamente atenuada, es decir, modificada en su genoma, de manera que no se afecten las características por las cuales se le ha elegido como modelo de investigación; así, si se utiliza como agente inmógeno recombinante, no se deberá afectar sus determinantes antigénicas, responsables de despertar la respuesta inmune, y si se utiliza como vector de expresión, la modificación no deberá alterar las características que ya se han mencionado.

La respuesta se ha obtenido en la utilización de la cepa atenuada conocida como MVA (Modified Vaccinia Ankara), una cepa que ha pasado las pruebas de seguridad al ser probada en humanos, mostrando una alta capacidad de recombinación y de expresión genética. La cepa ha sido obtenida en el laboratorio del Dr. Arthur Mayr, y su extrema atenuación consiste en una delección de 31,000 pb, por medio de 570 pasajes sucesivos en fibroblastos de embrión de pollo (CEF). Esta delección supone la supresión de un mínimo de dos genes del rango de hospedero (Sutterm y Moss, 1992), con lo cual se logró que la cepa pueda infectar, exprese sus genes, replique su genoma pero no forme partículas maduras, es decir que ha perdido la capacidad de producir progenie infectiva, ya que no existen las partículas maduras que salgan de la célula infectada e infecten a las células contiguas, por esto se dice que se realiza una infección abortiva o no productiva en células de mamífero (incluyendo a las células humanas), no así en CEF, en las cuales los virus son capaces de completar su ciclo infectivo, incluso con la formación de partículas virales infectivas, por lo cual se cree, que los CEF contienen un mínimo de un factor proteínico indispensable en la formación de las partículas virales (Sutter, 1992).

Como puede verse claramente, esta cepa representa el ideal de un modelo en la investigación de vectores, ya que tiene múltiples ventajas tales como una fácil recombinación y eficiencia de la expresión de los genes clonados, su uso tanto en el manejo en el laboratorio así como en la aplicación en la terapéutica, representa un bajo riesgo, o mejor dicho, una alta seguridad.

II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Como se ha dicho en el capítulo precedente, la transformación de las células epiteliales de la región genito-anal, depende de la integración del genoma de HPV al DNA celular con la subsecuente ruptura del gen E2, el cual actúa a manera de represor de los oncogenes virales E6 y E7. Así pues al estar involucrada la pérdida de un gen, se ha pensado en la posibilidad de proveerlo de manera artificial, valiéndose para ello de un vehículo con la capacidad de penetrar la célula, y con la ventaja de un aprovisionamiento endógeno de la proteína E2, producto del gen expresado por el vector. Dados los alentadores reportes acerca de la conveniencia de utilizar al virus de la vaccinia como el vehículo portador de un gen, se le ha tomado en cuenta en este proyecto, para el cual se propone la siguiente hipótesis:

" Se espera que la proteína E2 expresada por el virus de la Vaccinia sea capaz de reprimir la producción de las oncoproteínas E6 y E7, y por consiguiente, ocasionar la reducción del crecimiento tumoral, en células infectadas por Virus del Papiloma Humano".

Los objetivos perseguidos en este trabajo:

- 1) Construir un vector a partir de una cepa atenuada del virus de la vaccinia, que exprese la proteína E2.
- 2) Demostrar que la proteína recombinante E2 actúa

eficientemente reprimiendo la expresión de los genes bajo el control de la región reguladora LCR de HPV, en cultivos celulares.

3) Comprobar que la represión en la región LCR por la proteína E2 recombinante disminuye el crecimiento en células tumorales de CaCU humano en el modelo animal.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS.

Material biológico.

Plásmidos, bacterias, células y virus.

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron: el plásmido pIII gpt dsP usado en la construcción del virus recombinante que se usó para la comprobación de la actividad represora de la proteína E2 sobre el promotor LCR. Los plásmidos LCR- β Gal (para β -galactosidasa), el cual contiene el gen reportero Lac Z (de *E. coli*) adyacente a la región larga de control (LCR) de HPV 18; el plásmido 863.1, el cual contiene el gen que codifica la enzima cloramfenicol acetil transferasa (CAT) bajo el control del promotor LCR de HPV.

Los plásmidos arriba mencionados fueron purificados a partir de cultivos bacterianos, usando la cepa X -L-1 Blue.

Las células se crecieron con medio mínimo Eagle modificado por Dubelcco (D-MEM), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, adicionado con antibióticos (penicilina/estreptomina) e incubadas a 37° C y con atmósfera de CO₂ al 5%, realizando pasajes seriados cada tres a cinco días, dependiendo del tipo de células. Las líneas celulares utilizadas fueron: células C33 las cuales son células derivadas de riñón de ratón; células 3T3-F4 que son fibroblastos de ratón que expresan constitutivamente la enzima β -galactosidasa, bajo el control del promotor LCR de HPV 18; y células HeLa procedentes de un carcinoma cervical humano y que por tanto, es una línea inmortalizada y que expresa las oncoproteínas E6 y E7 de HPV, por tener el genoma viral integrado en el

genoma celular. Los fibroblastos de embrión de pollo (CEF) se obtuvieron como cultivo primario a partir de huevos embrionados de 12 días, y fueron crecidos en las mismas condiciones que las líneas anteriormente mencionadas. Para la titulación de virus se utilizaron monocapas confluentes de células de mono BS-C-1 (ATCC CCL 26).

La cepa atenuada registrada como Modified Vaccinia Ankara (MVA), fué donada por el profesor Arthur Mayr de Munich (Alemania).

Ratones.

Para la producción de tumores humanos se utilizaron ratones atómicos de la cepa *Mus musculus* de los laboratorios Taconics (USA), de 8 semanas de edad al momento de aplicar el respectivo tratamiento.

El manejo de las células, de los virus así como de los animales siempre se hizo en condiciones de esterilidad y con las medidas de seguridad que el caso requería, utilizando un gabinete de seguridad biológica clase II (Forma Scientific).

Medios de cultivo.¹

Medios de cultivo bacteriano.

El medio que se empleó en el crecimiento bacteriano fué el caldo Luria, y en algunos casos se usaron cajas de Petri conteniendo Agar-Luria.

Los medios se esterilizaron en el autoclave a 120°C y 15 Lb/Plg de presión durante 25 minutos. Los medios de cultivo con agar se vaciaron fundidos a cajas Petri desechables (aproximadamente 20 ml por caja), y se dejaron solidificar a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar estéril.

¹La preparación de los medios de cultivo utilizados se encuentra en el apéndice B.

Medios de cultivos celulares.

Estos medios fueron esterilizados por el método de filtración en un equipo Millipore (Stainless Sanitary Filter Holder, 142 mm), utilizando un filtro de 0.42 μm , con conexiones de látex siliconizado, previa esterilización del equipo.

En todos los casos se utilizó el medio D-MEM, suplementado con cantidades variables de SFB , de acuerdo con el uso que se dió al medio. Los medios siempre fueron adicionados con una combinación de ampicilina /tetraciclina (120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno) para evitar la contaminación por bacterias y hongos.

Tanto en la preparación de los medios bacterianos como en los medios para crecimiento de células se utilizó agua destilada y desionizada, esterilizada previamente.

Soluciones y reactivos.²

Durante los diversos experimentos elaborados , se utilizaron las siguientes soluciones:

- Acetato de potasio (BAKER) 5 M
- Acetato de sodio (BAKER) 3 M
- Ácido etilén-diamino tetrasódico (BAKER) 0.5 M
- Ácido mucofenólico (CALIBIOCHEM) 400 X
- Agarosa (SEA KEM GTG) al 1% y 1.5%
- Albúmina Sérica Bovina (SIGMA) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- Amortiguador de fosfatos (BAKER) pH 7
- Amortiguador de lisis
- Amortiguador de muestra

² La preparación de las soluciones se encuentra en el apéndice B.

Amortiguador Salino de Fosfatos (BAKER)
Bromuro de etidio (BRL) 10mg/ml
Cloruro de calcio (BAKER) 2.5 M
Cloruro de potasio (MERCK) 1 M
Cloruro de sodio (BAKER) 4 M
Cristal violeta (SIGMA) al 0.1%
Dodecil-sulfato de sodio (MERCK) al 10 %
Estreptomina (laboratorios BRISTOL) 20 mg/ml
Fosfato dibásico de sodio di-hidratado (BAKER) 1 M
Glucosa (MERCK) 1M
HEPES 1M
Hidróxido de sodio (MERCK) 10 N,
Hipoxantina (SIGMA) 670 X,
ONPG
Penicilina (USV-GROSSMAN) 20,000 U/ml
Reactivo de Bradford
Sacarosa ultrapura (GIBCO) al 40%, 36%, 32%, 28% y 24%
Solución Salina Isotónica (ABBOT)
TAE 50 X
TE 1X
Tripsina (GIBCO) al 0.25 %
Tripsina ultrapura, bicristalizada (WORTHINGTON) 0.25 mg/ml
Tris-HCl (BAKER) 2 M
Xantina (SIGMA) 40X

Los reactivos utilizados son:

Acetato de etilo (BAKER)

Ácido acético glacial (BAKER)
1- Butanol (BAKER)
¹⁴Cloranfenicol (AMERSHAM) 1mC / mL
Cloroformo (BAKER)
Cloruro de cesio (MERK)
DEPC (SIGMA)
Etanol absoluto (BAKER)
Fenol equilibrado con tris pH 8.5 (GIBCO)
Gene-Clean Kit (BIO 101)
Isopropanol (BAKER)
Lipofectina (GIBCO)
Lisozima (SIGMA)
Metanol (BAKER)
Películas sensibles para autorradiografía (AMERSHAM)
Placas de sílica gel (SIGMA)
soluciones reveladora y fijadora (KODAK)

Las enzimas y los amortiguadores para enzimas utilizados fueron los siguientes:

Acetil-coenzima A (SIGMA)
ASC-1 y su respectivo amortiguador (BOEHRINGER)
Bam HI y su respectivo amortiguador (BIOLABS)
Ligasa y su respectivo amortiguador (BOEHRINGER)
Proteinasa K (BOEHRINGER)
RNA asa A (SIGMA) 10mg /mL
Taq polimerasa y su respectivo amortiguador (PERKIN ELMER)
tRNA (GIBCO BRL)

Las soluciones fueron preparadas en todos los casos con agua estéril, bidestilada y desionizada. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y grado biología molecular según se requirió en cada experimento.

Metodología.

El trabajo se dividió en tres fases:

- A) Obtención de la cepa recombinante MVA-E2.
(construcción del vector).
- B) Comprobación de la represión en la región LCR, por la proteína E2 recombinante, en cultivos celulares.
- C) Comprobación de la represión de la expresión de los oncogenes E6 y E7, por la proteína E2 en tumores inducidos en ratones.

A) Obtención de la cepa recombinante MVA-E2

i) Preparación del concentrado viral MVA.

Dos días antes de la infección con la cepa viral MVA se hizo la correspondiente preparación de CEF³; el día de la infección se observaron las células al microscopio invertido para comprobar su viabilidad y confluencia.

Justo antes de su uso se mezclaron 100 µl de concentrado viral (10⁷ partículas infectantes) y 10 µl de tripsina (0.25 mg/ml); se agitó en vórtex vigorosamente, se incubó por 15 minutos a 37° C. Durante este período de

³ La preparación de los CEF se detalla en el apéndice A.

incubación del virus tripsinizado se prepararon los CEF, eliminando el medio con el cual crecieron y supliéndolo con 2 ml de medio D-MEM al 2% de SFB. Transcurrido el tiempo de incubación se agitó nuevamente la mezcla y se infectaron las células con una multiplicidad de infección de uno a tres pfu por célula (quedando una dilución final de aproximadamente 2.5 a 7.5×10^7 pfu/ml). Las células así infectadas fueron puestas en incubación, agitando suavemente con movimientos circulares, a intervalos de 15 a 20 minutos. Después de 2 horas de incubación se agregaron 27 ml de medio D-MEM al 10% de SFB, a cada una de las botellas de cultivo (Costar p150) dejándolas en incubación por tres días.

Para cosechar las células infectadas se rasparon las paredes de las botellas de cultivo con gendarmes estériles (Nunc), el medio se recolectó con una pipeta estéril; se centrifugó por 5 minutos a 1800 rpm; el medio sobrenadante se eliminó y el botón de células se resuspendió en 2 ml (por cada frasco de 150 cm^3) de medio fresco. La suspensión se congeló y descongeló tres veces agitando con la ayuda de un vórtex, en cada descongelación. El concentrado así obtenido se congeló a -70°C , para mantener la estabilidad en el título.

ii) Determinación del título viral.

Dos días antes de hacer la titulación del concentrado viral se crecieron células BS-C-1 dispuestas en placas de 6 pozos de 35 cm de diámetro (Costar), con medio al 10% de SFB. Su uso fue el apropiado cuando al observar al microscopio, con el objetivo 10 X, se vió una capa confluyente de células en cada pozo (aproximadamente 5×10^5 células en cada pozo). Para cada ensayo de titulación se realizó siempre un duplicado.

Al momento de ser infectadas las células, se preparó una mezcla de concentrado del virus obtenido en el protocolo anterior, conteniendo tripsina al

0.25%. A las células se les retiró el medio y se les agregaron 0.5 ml de medio D-MEM con al 2% de SFB. El primer pozo equivale al control de células y por lo tanto no se infectó; en el segundo pozo se colocaron 10 μ l del concentrado viral tripsinizado, y en los siguientes pozos se colocaron las cantidades adecuadas para tener diluciones seriadas de 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸. Las placas ya infectadas se colocaron en incubación de 1 a 2 horas, agitando periódicamente cada 15 minutos. Transcurrido el tiempo de infección se agregó a cada pozo 1.5 ml de medio D-MEM con SFB al 10 % y se dejó en incubación durante dos días. Después fue eliminado el medio, y se colocaron 0.5 ml de una solución de cristal violeta al 1% a cada uno de los pozos, se dejó incubar a 37°C, por 15 minutos, al cabo de los cuales, el cristal violeta fue aspirado con una pipeta Pasteur, se dejó secar y se contaron las placas producidas por el virus.

iii) Construcción del vector MVA-E2.

La estrategia común es colocar el gen deseado próximo a un promotor del virus de la vaccinia e insertar este "cassette" de expresión en el genoma del virus MVA por recombinación homóloga. Para ello se utilizó un plásmido (pIII gpt dsP A) que contiene un promotor sintético temprano-tardío del virus. La expresión del cassette es "flanqueada" por DNA del virus de la vaccinia (F1 y F2), para permitir la recombinación homóloga entre el plásmido que es transfectado y el DNA viral. Las secuencias de V V, F1 y F2, fueron elegidas de manera que la recombinación no interrumpa un gen esencial para V V. Para poder seleccionar la cepa recombinante MVA-E2 el plásmido también lleva un gen de resistencia, que codifica para la fosforribosil transferasa (gpt). Así, en la presencia de ácido mucofenólico (MPA) en el medio, se inhibe el metabolismo de las purinas interfiriendo con la replicación de V V. El efecto puede revertirse

por la expresión del gen *gpt* de *E. coli* en presencia de xantina e hipoxantina, de esta manera se pueden seleccionar y aislar las placas virales que contienen el gen deseado. La secuencia de F1 y F2, así como la construcción del plásmido pIII *gpt dsP* no están reportadas, por ser información personal (Dr. Ricardo Rosales). En la figura 4 se muestra la configuración del plásmido empleado.

Donde F1 y F2 son las regiones flancos de secuencias de V V, E2 equivale al gen clonado de HPV 18, *gpt* es el gen de resistencia al ácido mucofenólico en presencia de xantina e Hipoxantina y *dsP* es la región promotora (sintética) para V V.

iv) Digestión del plásmido pIII *gpt dsP*.

Se tomaron 10 µl del DNA del plásmido pIII *gpt dsP* (concentración 0.5 µg/µl), colocados en un tubo para centrifuga de 1.9 ml de volumen (eppendorf) y se agregaron 2 µl de amortiguador (10 X), 5 µl de enzima *Bam HI* (30 unidades), y 3 µl de agua-DEPC. Se incubó durante 2 horas a 37°C. Al terminar la incubación se hizo la limpieza del plásmido con una extracción con fenol/cloroformo (200 µl/300 µl respectivamente) y una con cloroformo (200 µl). La fase acuosa se recuperó en otro tubo y se añadió NaCl (concentración final 0.25 M), 600 µl de etanol absoluto y 20 µl de tRNA (concentración final 10 µl/ml), se agitó con la ayuda de vórtex y se precipitó el DNA en hielo seco durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm, por 5 minutos, el sobrenadante se eliminó por succión con una pipeta y la pastilla fué puesta en una centrifuga de vacío ("speed- vac") hasta sequedad total. La pastilla así obtenida se resuspendió en 10 µl de agua -DEPC.

Los mismos pasos se siguieron desde el principio, pero ahora utilizando la enzima *ASC-I* (30 U) con su respectivo amortiguador; así mismo se hizo una limpieza similar a la ya descrita anteriormente.

Para evitar la inhibición del ligamiento del plásmido por la presencia de altas concentraciones de ATP, se realizó la desfosforilación del extremo "rasurado" libre del DNA, adicionando a la muestra digerida 20 μ l de amortiguador de desfosforilación para CIP y 0.25 U de fosfatasa alcalina (CIP) de intestino de bovino. Se incubó por 30 minutos a 37°C. Al término de la incubación se adicionó EDTA (pH 8.0) y SDS a una concentración final de 5 mM y 0.5% respectivamente. Posteriormente se adicionó proteinasa K a una concentración final de 50 μ g/ml. Se incubó por 30 minutos a 56°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se hizo una extracción fenol y otra con fenol/cloroformo. Se adicionó 1/10 del volumen total, de acetato de sodio 3M (pH 7.0), mezclando bien y se colocó en refrigeración a 0°C, por 15 minutos. Se centrifugó a 14,000 por 10 minutos a 4 °C. La pastilla se lavó con etanol al 70 % a 4 °C y se recentrifugó.

v) Amplificación del gen que codifica para la proteína E2.

El método usado convencionalmente es la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El ensayo de PCR se ajustó al siguiente protocolo:

A 1 μ l de DNA del gen E2 de HPV 18 (obtenido de la digestión del plásmido p18), se colocó en un tubo con capacidad para 50 μ l (Perkin Elmer), juntamente con 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos GS 82 y GS 83, también con 10 μ l de mezcla de nucleótidos (NTP's concentración final 2.5 mM de cada uno), 1 μ l de Taq polimerasa y 76 μ l de agua-DEPC. Las condiciones en que se llevó a cabo la amplificación fueron un minuto a 94°C,

45°C por 2 minutos y 72°C durante 2 minutos, y se dieron 30 ciclos en un termociclador (Perkin Elmer 900).

Cuando se hubieron completado los ciclos de amplificación del DNA, se tomaron 10 µl del mismo, los cuales fueron cortados con las enzimas *Bam HI* y *ASC-I* y analizados en un gel de agarosa al 1% en amortiguador de TAE y teñido con Bromuro de etidio en solución (0.5 µg/ml).

vii) Purificación del gen E2

Se cortaron las bandas pertenecientes al gen E2 (920 pb), observadas en el gel de agarosa y se procedió a su limpieza por el método "Gene-Clean" (Bio-101).

vii) Construcción del vector MVA-E2.

Se tomaron 2 µl del plásmido pIII gpt dsp tratado según los protocolos anteriores, y se llevaron a un volumen final de 20 µl con agua (DEPC). De esta dilución se tomó 1 µl, colocándolo en un tubo para microcentrifuga, se añadieron 10 µl del gen E2 amplificado previamente, aquí mismo se agregaron un µl de enzima ligasa y 4 µl de su respectivo amortiguador. Se mezcló perfectamente y se permitió incubar durante toda la noche a la temperatura de 4°C. Al día siguiente, la mezcla se colocó en un baño caliente de 65°C durante 10 minutos, para lograr la inactivación de la ligasa. La mezcla de ligamiento se usó para transfectar bacterias X-L-Blue.

Posteriormente se aislaron colonias bacterianas realizando "minipreparaciones"⁴ y verificando que el plásmido contuviera el gen E2 insertado. Después de aislada la clona adecuada, se procedió a purificar un poco del plásmido recombinante pIII gpt dsP-E2 por medio de la técnica de

⁴Según el método del manual de "Biología Molecular" de Maniatis et al.

"maxipreparación"⁵ con el fin de tener DNA suficiente para la construcción de la cepa recombinante MVA-E2.

viii) Transfección del plásmido pIII gpt dsP-E2 en CEF e infección con virus MVA.

Se tomaron 10 μ l del plásmido obtenido en los pasos anteriores, y con ellos se transfectaron CEF contenidos en una caja Petri (Nunc) desechable (aproximadamente 5×10^6 células). Al siguiente día estas mismas células fueron infectadas con una cantidad de 10 μ l del concentrado de virus MVA, previamente titulado (0.05 pfu), colectando las células dos días después de su infección, centrifugándolas para resuspender la pastilla de células en 1ml de medio D-MEM. Partiendo de esta suspensión de células se hicieron diluciones seriadas en el orden de 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-5} , con las cuales fueron infectadas CEF colocadas en placas de 6 pozos. 2 o 3 días después, cuando la formación de placas fué evidente en el pozo correspondiente a la infección con la dilución de 10^{-2} , se tomaron de este pozo 5 placas con pipeta Pasteur y con ellas se re infectaron CEF, en placas de 6 pozos, y así fué hecho sucesivamente hasta 6 pasajes, en el último de los cuales se obtuvo el concentrado viral con el cual se infectaron CEF contenidos en una botella para cultivos celulares de tamaño p150 (Costar). Cabe señalar que durante las rondas de purificación, se agregaron al medio las drogas para selección de los virus recombinantes: MPA en una dilución final de 1/400 con respecto al medio; xantina (conc. final 1/40) e hipoxantina (conc. final 1/670).

⁵Según el método del manual de "Biología Molecular" de Maniatis et al.

iv) Análisis de la inserción del gen E2 en el virus MVA.

A 1 ml de stock de virus MVA-E2 se le adicionaron 1ml de amortiguador TE (10 mM), tris-HCl pH 8, EDTA 1 mM y 100 µL de proteinasa K (10 mg/ml). Se incubó por 24 horas a 37°C; posteriormente se realizó una extracción fenol/cloroformo (200 µl/300 µl) y una más con cloroformo (300 µl). Al sobrenadante se le agregó NaCl a una concentración final de 0.25 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, de esta manera se dejó precipitar el DNA toda la noche a -20°C; posteriormente se centrifugó y la pastilla de DNA se resuspendió en agua -DEPC a una concentración de 1µg/µl.

Con el DNA obtenido se corrió un ensayo de PCR de acuerdo con el siguiente protocolo:

1 µl del DNA, 1µg de cada uno de los oligonucleótidos GS 82 (5'-GGT TGT TGA TGG ATC TGT GAT GCA TGC GAT AGC TGA-3') y GS 83 (5'-GAA TGC ACA TAC ATA AGT ACC GGC ATC TCT AGC AGT-3'), 10 µl de amortiguador para taq polimerasa (10 X), 10 µl mezcla de NTP (2.5 mM), 1 µl Taq polimerasa (5 U/µl), 76 µl agua DEPC.

Las condiciones fueron: 94 °C por 1 minuto, 45 °C durante 2 minutos, 72 °C por 2 minutos, y se realizaron 30 ciclos de extensión del DNA.

De la mezcla de reacción de PCR, se tomaron 10µl del DNA resultante los cuales fueron cortados con las enzimas de restricción *Bam HI* y *ASC-1*, con los cual fueron analizados en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE, y teñidos con bromuro de etidio.

x) Purificación del virus

Los concentrados virales resultantes de las propagaciones de virus en CEF se centrifugaron 20 minutos a 8 000 rpm; la pastilla de virus se resuspendió en 1.4 ml de tris-HCl 10 mM de pH 9.0, los cuales fueron puestos en un

homogenizador de vidrio (Dounce) y se dieron de 20 a 30 golpes con el pistón, se centrifugó a una velocidad de 14 000 rpm por 5 minutos a 4°C, para remover los restos celulares. El sobrenadante se colocó en un tubo para centrífuga y la pastilla se centrifugó nuevamente, el sobrenadante se juntó con el anterior; después se colocaron los sobrenadantes sobre un colchón de sacarosa al 36% (17 ml) y se centrifugó en ultracentrífuga a 13,000 rpm durante 80 minutos con temperatura de 4°C en un rotor SW 27. El sobrenadante se descartó y la pastilla de virus se resuspendió en 1 ml de Tris-HCl 1mM de pH 9.0. Se preparó un gradiente continuo de sacarosa, disponiendo cuidadosamente en un tubo para centrífuga (Beckman SW 27) 6.8 ml de las soluciones de sacarosa al 40%, 36%, 32% 28% y 24%, en ese orden dejando este gradiente en refrigeración a 4°C toda la noche.

La pastilla resuspendida del virus se colocó en la capa superior del gradiente continuo de sacarosa y de esta manera se centrifugó a 12,000 rpm durante 50 minutos a 4°C. Al terminar la centrifugación, la banda de lechos virales que se sitúa en la mitad del tubo, se recolectó con una pipeta estéril, y fué resuspendida en 1 ml de Tris HCl pH 9 (1 mM). Para comprobar la esterilidad del virus, éste fué plaqueado en una caja Petri conteniendo agar- Luria (sin antibióticos). Para determinar la cantidad aproximada de virus, se tomaron 200 µl de la suspensión viral y se leyeron a 260 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer). El virus purificado se almacenó a -70 °C.

B) Comprobación de la represión en la región LCR, por la proteína E2 recombinante en cultivos celulares

i) Análisis de la actividad de la enzima β -galactosidasa.

a) Transfección transitoria de plásmido LCR- β gal en células C33⁶.

Se rotularon 12 tubos para microcentrífuga estériles y se colocaron aproximadamente 20 μ g del plásmido LCR- β gal, se adicionaron 20 μ l de lipofectina (GIBCO BRL) en cada, uno de los tubos, agitando cada tubo al momento de agregar la lipofectina, y después se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, para permitir la formación del complejo DNA/lipofectina (liposoma). Al mismo tiempo, a 15 cajas Petri conteniendo células C33 con una confluencia del 70-80%, les fué retirado el medio y se les añadió a cada caja 2 ml de PBS estéril, haciendo un lavado, los cuales le fueron retirados para sustituirlo por 2 ml de medio D-MEM suplementado con SFB al 5%. A doce de las cajas con células se les agregó el complejo plásmido/lipofectina, y tres sirvieron como el control de las células. Se incubaron las células así tratadas, durante tres horas a 37°C, y con atmósfera de CO₂, rotando las cajas periódicamente cada 20 minutos. Al terminar el tiempo de incubación, se agregaron 6 ml de medio D-MEM con SFB al 10% y se dejaron por 24 horas en las mismas condiciones de incubación.

b) Infección de las células C33 con virus.

En tubos de 2 ml de capacidad se prepararon las siguientes mezclas: 20 μ l del concentrado de virus MVA (10⁹ ufp/ml) con 2 μ l de tripsina (2.5 mg/ml) para infectar tres cajas (5.5 μ l de esta mezcla por cada caja). En otro vial se colocan 650 μ l del concentrado del virus MVA-E2 con 65 μ l de tripsina, para

⁶ La preparación de los plásmidos aquí utilizados se encuentra detallada en el apéndice A.

infectar tres cajas de células (220 µl de esta mezcla por cada una); y por último en otro tubo vial se mezclaron 1300 µl del concentrado viral MVA-E2 con 130 µl de tripsina para infectar tres cajas de células (400 µl cada caja). Las mezclas preparadas se agitaron en vórtex y fueron puestas en incubación por 15 minutos a 37°C, en tanto se prepararon las cajas con células, retirándoles el medio de crecimiento y sustituyéndolo por 2 ml de medio D-MEM al 2% de SFB. Al término de la incubación de los virus tripsinizados, nuevamente se agitaron en vórtex para favorecer la liberación de los virus de las membranas celulares, e inmediatamente se agregaron a las células, siendo rotuladas debidamente para permitir su identificación; tres cajas transfectadas anteriormente fueron dejadas sin infección para servir como control del plásmido (control positivo) y desde luego también se dejaron sin infección las células que fueron usadas como control de las mismas (control negativo), y nueve cajas fueron tanto transfectadas como infectadas. Todas las células fueron incubadas 1.5 horas, durante las cuales se rotaron las cajas petri cada 20 minutos suavemente, para favorecer la infección de las células. Al cabo del período de infección, se agregó a cada caja un volumen de 6 ml de medio D-MEM al 10% de SFB. Posteriormente fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

c) Ensayo de β- galactosidasa.⁷

Se retiró totalmente el medio de cada una de las cajas Petri conteniendo las células C33 transfectadas e infectadas (la recolección de las células infectadas con MVA-E2 se hizo a las 24, 36 y 48 hr). Se lavaron con 2 ml de PBS y se colocaron 100 µl de amortiguador de lisis sobre la capa celular, posteriormente se raspó el fondo de cada una de las cajas cuidadosamente con gendarmes estériles; esta suspensión de células se colocó en un tubo para

⁷Ver infección de células C33 con virus.

microcentrifuga. Se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm, a temperatura ambiente. Esta operación se realizó caja por caja. Después se realizaron dos ciclos de congelamiento/descongelamiento para permitir la salida de la enzima β -galactosidasa de las células. Después se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos y se procesaron las muestras de acuerdo al siguiente protocolo :

	BLANCO	1	2	3	4	5
		C 33	β -GAL	MVA	MVA-E2	MVA-E2
EXT.		200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
A.L	200 μ l					
A.F	800 μ l	800 μ l	800 μ l	800 μ l	800 μ l	800 μ l
ONPG	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l

Este protocolo se realizó por triplicado. Las muestras se incubaron a 37°C hasta la aparición de coloración amarilla (aproximadamente 2.5 horas). Posteriormente las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

d) Determinación de proteínas totales.

La determinación de proteínas totales en los extractos de las células, se hizo por el método de Bradford, de acuerdo al siguiente protocolo:

	BLANCO	1	2	3	4	5
EXT.		10 μ l				
R.B.	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

Se agitaron las muestras y fueron leídas inmediatamente a 595 nm.

Para poder cuantificar las proteínas totales, se corrió una curva de calibración utilizando albúmina de suero de bovino (ASB), a partir de un concentrado cuya concentración es de 1 mg/ml y usando 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ l de la solución de albúmina, llevándolas a un volumen final de 5 ml con el reactivo de Bradford (R.B.); como blanco de calibración se utilizó este último. Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a 595 nm .

ii) Infección de células 3T3-F4

Se prepararon 12 cajas Petri conteniendo células 3T3-F4 con una confluencia del 100%, las cuales fueron infectadas de igual manera y con las mismas cantidades de virus que las células C33, pero en las tres cajas infectadas con MVA-E2 se colocaron 200 μ l del concentrado y las otras tres cajas fueron infectadas utilizando 400 μ l del mismo concentrado viral, dejando 3 cajas libres de infección como control negativo. La determinación de los niveles de β -galactosidasa, así como la cuantificación de proteínas totales también se ajustaron a los mismos protocolos para las células C33, utilizando la misma curva de calibración .

iii) Análisis de la enzima CAT bajo el control del promotor LCR.

a) Transfección de células con el plásmido 863.1

Se marcaron 9 tubos para microcentrífuga estériles y en cada uno de ellos se colocaron 2 μ l de plásmido 863.1 (ver plásmidos, bacterias y virus), y se adicionaron 20 μ l de lipofectina, mezclando homogéneamente. Se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. En tanto a 12 cajas de células C33 que previamente se dejaron crecer hasta 70-80% de confluencia, se les retiró el medio y se les agregaron 2 ml de medio D-MEM al 10% de SFB. Se adicionó a cada caja de células, el plásmido más lipofectina, excepto a tres

cajas, las cuales fueron utilizadas como control negativo. Después de la transfección (3.5 horas), se agregaron 6 ml del mismo medio y se colocaron a 37°C por 24 horas.

b) Infección con virus de las células C33 transfectadas.

Al día siguiente de la transfección (plásmido 863.1) se prepararon los virus de la siguiente manera: fueron tomados 10 µl del concentrado de virus MVA (concentración 10⁹ virus/ml) y se llevaron a 1 ml con medio D-MEM. A 100 µl de esta dilución se agregaron 10 µl de tripsina (2.5 mg/ml) con los cuales se infectaron tres cajas. Del concentrado de virus MVA-E2 se tomaron 400 µl mas 40 µl de tripsina, por cada caja que se infectó (en total tres cajas). La infección de las células se realizó de acuerdo con la siguiente relación: tres cajas de células sin transfectar que tampoco se infectaron (control negativo), tres cajas transfectadas no fueron infectadas (control positivo), tres fueron infectadas con virus MVA, y tres más lo fueron con el virus MVA-E2.

c) Ensayo de CAT.

Se recolectaron las células colocando el producto de cada caja en un tubo para microcentrífuga, y se hicieron tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. Se preparó la siguiente mezcla para cada uno de los tubos: 10 µl de cloramfenicol radiactivo (¹⁴C), 15 µl de Aceti-coenzima A (4 M), 100 µl de tris-HCl pH 7.5, 2 M (conc. final 0.25 M) y 525 µl de agua-DEPC. Los extractos celulares así preparados fueron puestos en incubación durante una hora a 37 °C, y al término de la misma se dividió el contenido de cada uno de los tubos en dos partes iguales y les fueron agregados 800 µl de acetato de etilo a cada uno, agitando con vórtex por 10 segundos y posteriormente centrifugando 5 minutos a 14,000 rpm. El acetato de etilo de cada tubo fué colectado y colocado en otros tubos. Los sobrenadantes de

acetato de etilo se colocaron en una centrifuga de vacío hasta sequedad total. La pastilla resultante en cada tubo se resuspendió en 10 µl de acetato de etilo.

Se preparó una cromatoplaaca de sílica (15 x 15 cm), colocando en ella cada una de las muestras obtenidas en los pasos anteriores, en series de 4 muestras (control negativo, control positivo, infección con MVA, e infección con MVA-E2). Cuando el acetato de etilo se hubo evaporado totalmente de la placa, ésta se sometió al corrimiento por arrastre no polar, introduciéndola en una cámara de elución conteniendo una mezcla de cloroformo/metanol (19:1) equilibrada cuando menos 4 horas antes de su uso. Se dejó llegar el frente de la placa hasta aproximadamente 3/4 de la altura total de la placa (aproximadamente 45 minutos). Posteriormente se secó y se expuso para autorradiografía colocando después una película sensible (Amersham). Se colocó a -70°C por una o dos semanas, obteniendo dos placas las cuales fueron reveladas por el método convencional para el ensayo de auto-radiografía. (soluciones reveladora y fijadora de Kodak).

C) REPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES E6 Y E7 POR LA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE EN TUMORES

i) Inducción de tumores humanos en ratones atímicos y tratamiento local con virus MVA o MVA-E2.

Se utilizaron 19 ratones, los cuales fueron inyectados por vía subcutánea con 200 µl de una suspensión de células HeLa en solución salina isotónica (SSI). Para obtener esta suspensión, las células fueron crecidas previamente en medio D-MEM al 10% de SFB, tripsinizadas y lavadas dos veces con SSI y contadas al microscopio, para calcular su dilución. Finalmente se

resuspendieron en el volumen necesario de SSI para tener 1×10^6 células en 200 μ l de SSI.

Se dejaron crecer los tumores durante un mes al término del cual los animales se separaron en tres lotes, tratando de hacer una distribución equitativa de acuerdo al tamaño de la masa tumoral, de esta manera 6 ratones fueron utilizados como controles de tumor inyectandoles SSI; otros 6 ratones fueron tratados con inyecciones de virus MVA, y los restantes 7 ratones fueron infectados con la cepa recombinante MVA-E2. Se inocularon cantidades equivalentes en pfu's, de ambos virus a los respectivos ratones, en una cantidad aproximada de 1.46×10^6 pfu/ratón. El respectivo tratamiento les fué aplicado a todos los ratones con la inyección directamente sobre el tumor de la respectiva suspensión. En el caso de los ratones utilizados como control se les inyectó con 50 μ l de SSI. La administración de cada uno de los tratamientos se hizo en dos ocasiones con una diferencia de dos semanas entre una y otra.

ii) Evaluación del crecimiento de la masa tumoral.

Después de una semana, desde la primera aplicación de la inyección, los tumores fueron medidos con un vernier cada semana durante cinco semanas; las mediciones hechas tomaron en cuenta tanto el largo como el ancho del tumor de cada ratón.

IV.- RESULTADOS.

A) OBTENCIÓN DE LA CEPA RECOMBINANTE MVA-E2.

La clonación del gen E2 dentro del genoma del V V, se llevó a cabo gracias a un proceso de recombinación genética *in vivo*, para lo cual se empleó un plásmido, que contiene un promotor temprano-tardío sintético del V V, con lo cual se pretendió alcanzar una gran producción de RNA (y por lo tanto de la proteína deseada). En la figura 4 se muestra la estrategia de recombinación para la construcción de la cepa recombinante seguida. La correcta inserción del gen E2 de HPV 18 en el genoma de MVA fué corroborada con la ayuda de la técnica de PCR. Se amplificó el DNA aislado de la cepa recombinante MVA-E2 y posteriormente se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos GS 82 y GS 83. Posteriormente los productos de PCR se cortaron con las enzimas de restricción *ASC-1* y *Bam HI* (cuyos cortes fragmentan precisamente al gen clonado). La digestión fué analizada en geles de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. En la figura 5 se muestra el resultado del corrimiento electroforético.

CONSTRUCCION DE UNA CEPA RECOMBINANTE CON
EL VIRUS DE LA VACCINIA QUE CONTIENE INTEGRADO
EL GEN E2 VPH 18.

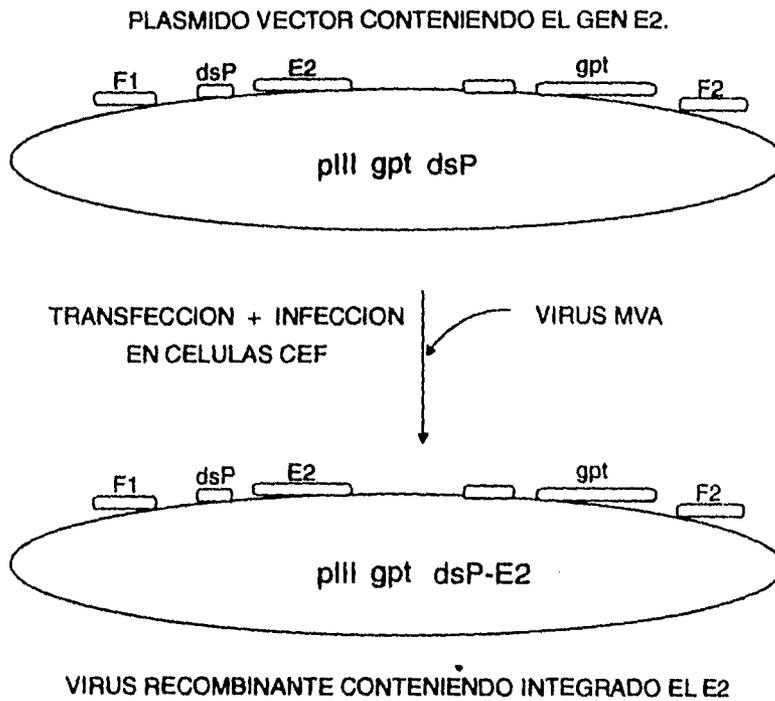


FIGURA 4

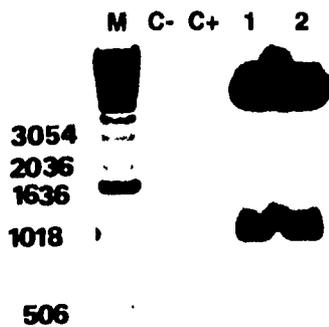


FIGURA 5. ANÁLISIS DEL DNA DEL VIRUS MVA-E2. El DNA del virus se extrajo por método de extracción fenol cloroformo y el fragmento obtenido se amplificó por PCR; el producto de esta amplificación se cortó con las enzimas de restricción *Bam HI* y *Asc-1*. Posteriormente se analizó en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio (0.5 μ l/ml). **M** representa el marcador de pesos moleculares (1Kb escalera), 1 y 2 son productos de PCR del DNA proveniente de virus MVA-E2-4 y MVA-E2-11 respectivamente (que sólo difieren en el día de infección de CEF); la banda de 920 pb corresponde al gen E2, y la banda de 5000 pb (aprox.) es un producto inespecífico de PCR.

B) LA PROTEÍNA RECOMBINANTE E2 REPRIME LA ACTIVIDAD DE LCR DE HPV EN CULTIVOS CELULARES.

Para analizar la capacidad de represión de la proteína E2 producida por MVA, se realizaron infecciones con las cepas MVA y MVA-E2 en células que contuvieran la región promotora LCR de HPV, (sitio de unión específico de E2). Se utilizaron genes reporteros (β -GAL y CAT) adyacentes a la región LCR, con el fin de analizar la regulación en la expresión de sus productos proteínicos, bajo la influencia de la región promotora de HPV (LCR) en presencia y ausencia de la proteína E2 recombinante.

Con esta intención se realizaron ensayos de transfección transitoria en células C33, introduciendo en las células el plásmido LCR- β GAL, para posteriormente infectar con virus MVA o MVA-E2. Las células se recolectaron a diferentes tiempos. Posterior a la infección, la actividad de la enzima fue cuantificada por espectrofotometría, (tabla 4) para cuantificar las proteínas se usó el método de Bradford, usando una curva de calibración (para albúmina) la cual se muestra enseguida (tabla 3, figura 6).

TABLA 3

Conc. Albúmina (mg/mL)	Absorbancia (D.O)
0	0.000
5	0.134
10	0.180
20	0.337
30	0.453
40	0.524
50	0.612

Una vez obtenidas las concentraciones de proteínas totales, se procedió a la determinación de la actividad enzimática para β -galactosidasa, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{D.O.} \times \text{Factor de Dilución del Extracto} = \frac{\text{Unidades}}{\text{tiempo de incubación en horas}} \text{ de } \beta\text{-gal.}$$

Donde:

$$\text{F. D.} = 6$$

$t = 2.33\text{hr}$, y las D.O. se muestran en la tabla 4.

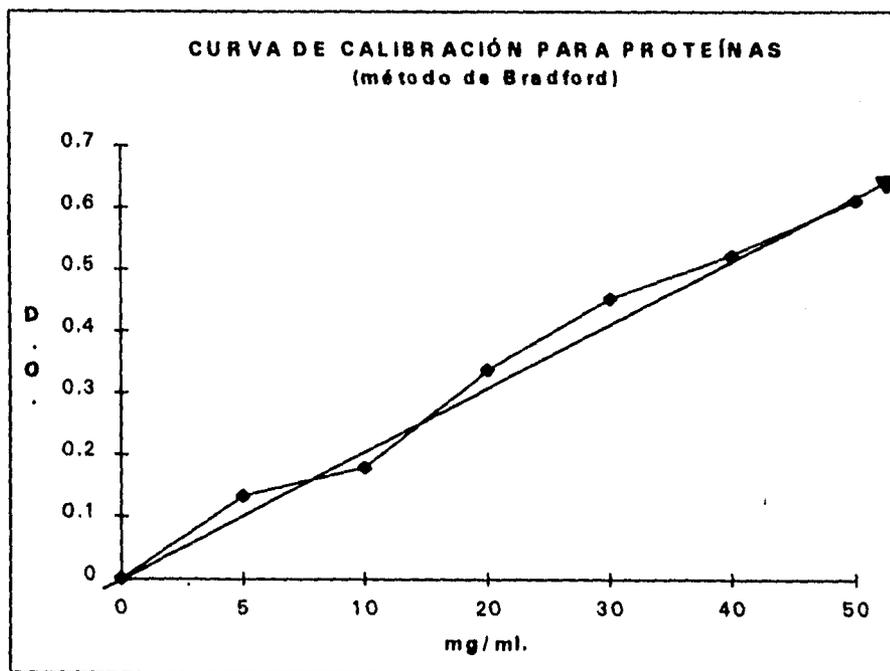


FIGURA 7.

TABLA 4

MUESTRA	D.O (proteínas)	D.O (β -galactosidasa)
Blanco	0.000	0.000
Control -	1.240	0.284
Control +	0.974	0.440
MVA	0.787	0.498
MVA-E2 (24 hr)	0.797	0.482
MVA-E2 (36 hr)	1.012	0.531
MVA-E2 (48 hr)	1.107	0.596

Las concentraciones de proteínas así como de unidades de β - galactosidasa y la actividad específica, se muestran en la tabla 5.

TABLA 5.

MUESTRA	Prot.Tot. (mg/ml)	U . β -gal. (U/ml)	Act. Esp. (U/mg)
Control -	9.99	3.66	0.3658
Control +	7.74	5.67	0.7319
MVA	6.16	6.30	1.023
MVA-E2(24 hr)	6.25	6.20	0.992
MVA-E2(36 hr)	8.06	6.80	0.843
MVA-E2(48 hr)	8.87	7.70	0.868

Considerando al control positivo (LCR β -GAL) como el 100 % de la cantidad de β -galactosidasa producida, en referencia a los demás valores calculados se obtienen los porcentajes que se muestran en la tabla 6.

TABLA 6

MUESTRA	Conc. de Enzima (%)	Disminución (%)
MVA	100.00	0.00
MVA-E2 (24 hr)	96.97	3.03
MVA-E2 (36 hr)	82.43	17.60
MVA-E2 (48 hr)	84.85	15.15

Estos datos muestran una clara disminución en la cantidad de enzima expresada (figura 7).

El mismo ensayo se repitió haciendo uso de las células 3T3-F4, las cuales tienen como característica el expresar constitutivamente la enzima β -galactosidasa, bajo el control de la región promotora de HPV, LCR (Guido y García, no publicado). Estas células fueron infectadas con extractos virales de MVA ó MVA-E2, de éste último se utilizaron dos dosis diferentes. La actividad enzimática fué cuantificada a partir de los extractos celulares como se ha descrito. Los resultados de las lectura de D.O. para cuantificación de proteínas totales, así como para β -galactosidasa, se muestran en la tabla 7.

TABLA 7

MUESTRA	D.O (proteínas)	D.O.(β -galactosidasa)
Control +	0.378	0.806
MVA	0.348	0.730
MVA-E2 (200 μ l)	0.402	0.733
MVA-E2 (400 μ l)	0.432	0.709

Las concentraciones calculadas y la actividad específica se muestran en la tabla 8.

TABLA 8

MUESTRA	Prot.Tot. (mg/ml)	β -gal.(U/ml)	Act. Esp. (U/mg)
Control +	3.35	96.70	28.86
MVA	3.07	87.60	28.53
MVA-E2 (200)	3.58	87.95	24.56
MVA-E2 (400)	3.85	85.08	22.09

Y si consideramos que el control positivo, corresponde al 100% de expresión del gen de β -galactosidasa, se obtienen los siguientes porcentajes (tabla 9) los cuales se grafican en la figura 8.

TABLA 9

MUESTRA	Conc. de enzima (%)	Disminución (%)
Control +	100.00	0.00
MVA	98.85	1.15
MVA-E2 (200)	85.10	14.90
MVA-E2 (400)	76.57	23.00

Otro ensayo en donde se observó también la represión en la región LCR y la consiguiente falta de expresión de los genes bajo su control, por la proteína E2 recombinante, fué realizado utilizando el plásmido 863.1, el cual contiene al gen reportero que codifica al enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT), bajo la influencia de la región promotora LCR de HPV. Dicho plásmido se transfectó en células C33, las cuales posteriormente fueron infectadas con

virus MVA o MVA-E2. La actividad enzimática de los extractos celulares se evaluó 24 horas después de la infección de las células, analizando los extractos de las mismas en un ensayo de autorradiografía. Los resultados se muestran en la figura 9 (ver materiales y métodos).

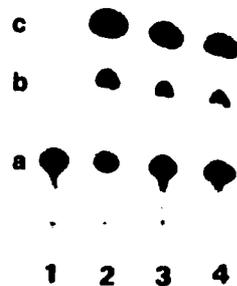


FIGURA 10. ENSAYO DE CAT. Autorradiografía de los extractos de células C33 transfectadas con el plásmido 863.1 e infectadas con virus MVA o MVA-E2, 24 horas después de la transfección. La placa fué revelada una semana después de su exposición. 1 corresponde al Control negativo (células C33 sin transfección/infección), 2 corresponde al control positivo (células C33 transfectadas con el plásmido 863.1), 3 y 4 son los extractos de células transfectadas con el plásmido 863.1 e infectadas con virus MVA y MVA-E2 respectivamente. Obsérvese la intensidad de las marcas b y c (correspondientes a la 1ª y 2ª acetilación del cloramfenicol radiactivo) entre 2 y 3, y 2 y 4. Obsérvese también, las cantidades de muestra colocada (línea a), con relación al tamaño de b y c, compárese 2 con 4.

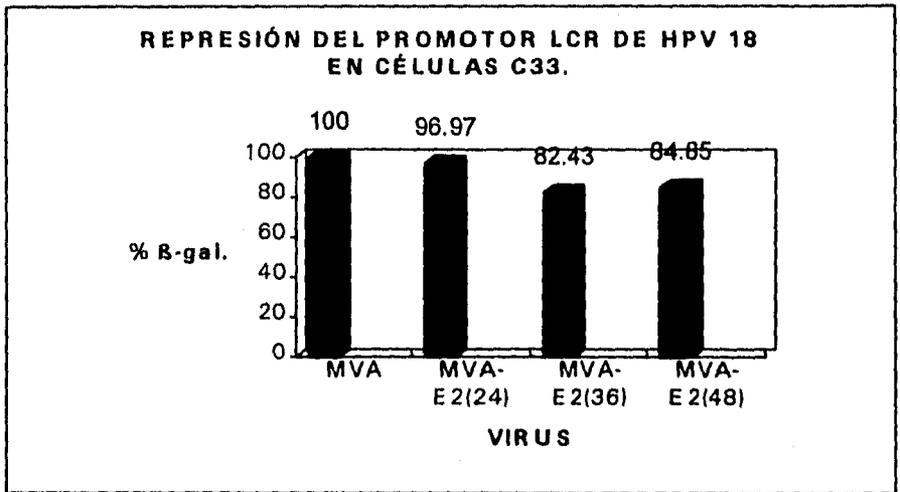


FIGURA 7.

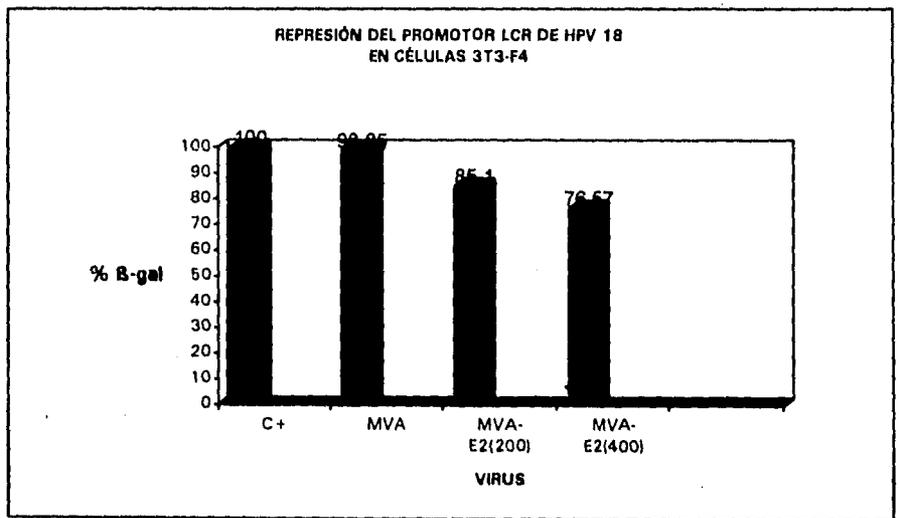


FIGURA 8.

C) LA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE LOS ONCOGENES E6 Y E7 EN TUMORES.

Con el fin de valorar la actividad de la proteína E2 recombinante directamente sobre los oncogenes E6 y E7, se realizó un experimento en el cual se indujo la formación de tumores en ratones desnudos, con células HeLa, las cuales expresan dichos oncogenes. La inyección localizada (directamente sobre el tumor) de virus MVA o MVA-E2 o de SSI se hizo con un detenido seguimiento del desarrollo de la masa tumoral por medio de mediciones en las cuales se tomó en cuenta tanto el largo como el ancho del tumor. Los valores obtenidos se utilizaron para calcular las áreas tumorales. En la tabla 10 se muestran dichos resultados.

TABLA 10.

No. ratón	Tratamiento	AREA (cm ²)				
		0	7	14	21	28
1	SSI	1.58	1.78	1.96	2.40	2.42
2	SSI	0.57	0.88	0.92	1.80	1.70
3	SSI	1.39	1.82	1.92	2.32	2.43
4	SSI	2.95	3.00	3.16	5.95	4.20
5	SSI	3.38	3.46	3.20	3.91	3.72
6	MVA	0.96	1.42	2.85	3.95	4.02
7	MVA	0.54	0.80	1.30	1.48	1.48
8	MVA	1.66	2.10	3.44	3.66	3.72
9	MVA	1.32	4.75	3.74	4.16	4.29
10	MVA	1.47	2.28	2.88	1.18	4.35
11	MVA	1.47	2.38	2.56	4.18	4.44
12	MVA-E2	0.98	1.03	1.12	1.70	1.73
13	MVA-E2	1.82	2.26	1.32	1.65	1.65
14	MVA-E2	0.92	1.00	1.71	1.70	1.70
15	MVA-E2	1.90	1.37	2.45	2.24	2.08
16	MVA-E2	1.00	1.50	2.04	1.89	1.98

Para graficar (figura 11) se obtuvieron los promedios de las áreas de acuerdo al tratamiento recibido por cada grupo de ratones (tabla 11), con lo cual se aprecia el efecto global de la proteína E2 sobre los tumores.

TABLA 11

DIAS	0	7	14	21	28
SSI	1.974	2.188	2.232	3.270	2.894
MVA	1.236	2.288	2.788	3.601	3.710
MVA-E2	1.324	1.433	1.728	1.836	1.828

El índice de crecimiento entre una semana y otra se obtuvo restando los valores de las áreas entre una semana y la anterior después de obtener el promedio de todos los ratones con el mismo tratamiento, correspondiente a cada semana. Considerando a cada uno de los tratamientos, se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 12 y su grafica se muestra en la figura 11.

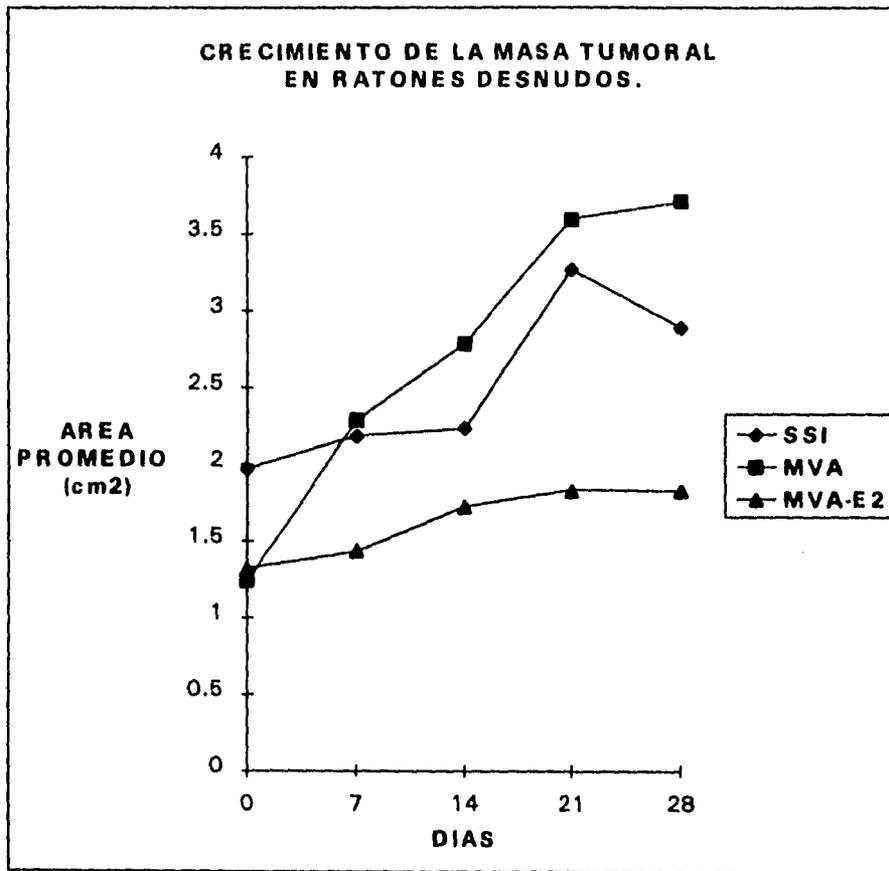


FIGURA 10

TABLA 12

DIA	7	14	21	28
No. RATON				
1	0.20	0.18	0.44	0.02
2	0.30	0.04	0.88	0.10
3	0.43	0.10	0.40	0.11
4	0.05	0.16	2.79	-1.75
5	0.08	0.26	0.70	-0.19
PROMEDIO	0.21	0.03	1.04	-0.14
6	0.46	1.43	1.10	0.07
7	0.26	0.50	0.18	0.00
8	0.44	1.34	0.22	0.06
9	0.81	-1.01	0.41	0.13
10	0.81	0.60	1.13	0.17
11	0.91	0.18	1.62	0.22
PROMEDIO	0.62	0.50	0.77	0.11
12	0.05	0.08	0.58	0.03
13	0.44	-0.94	0.33	0.00
14	0.08	0.71	- 0.01	0.00
15	-0.53	1.08	0.21	0.16
16	0.50	0.54	-0.15	0.09
PROMEDIO	0.11	0.29	0.19	0.04

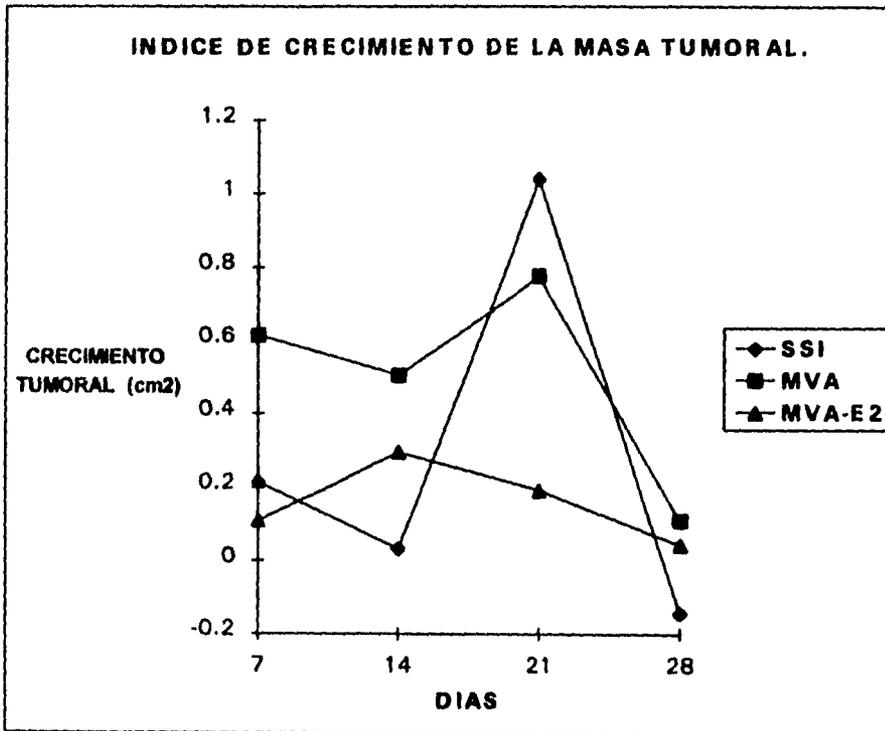


FIGURA 11.

V.- DISCUSIÓN.

En casos de cáncer, la transformación de las células acontece debido a que se ha perdido el control en el crecimiento normal y, como ahora se sabe, el ciclo celular está controlado por elementos genéticos (factores de transcripción, oncogenes, genes supresores de tumor, etc.), por lo tanto, la pérdida, ya sea por mutación o delección, de estos elementos genéticos llamados genes, acarrea la desregulación y por consiguiente un crecimiento anormal de las células, llevando a la formación de tumores. Ahora la terapia genética se ha enfocado al reemplazo de estos genes alterados por medio de vectores de clonación (como el uso de retrovirus). En el caso específico de Cáncer Cervico-Uterino, la transformación de las células epiteliales de la zona ano-genital, es causada por la infección de Virus de Papiloma Humano (generalmente de los tipos 16 y 18), los cuales penetran a la célula y pueden o no integrarse al genoma de la célula huésped. En caso de no insertarse (permaneciendo en forma episomal), la infección permanece en estado latente y se habla de una lesión benigna. Cuando ocurre lo contrario y el genoma viral se integra en el celular, ocurriendo la ruptura del gen E2, cuyo producto es una proteína de 48 KD, la cual se une a una secuencia específica de la región LCR, promotora de los oncogenes virales E6 y E7, por lo cual actúa como un represor de la transcripción de los mismos. Al encontrarse incompleto el gen E2 la proteína no se produce permitiendo con esto, la libre expresión de los genes E6 y E7, cuyos productos proteínicos afectan el ciclo celular al formar complejos con los anti-oncogenes celulares *Rb* y *p53*.

En casos como el descrito, la cepa atenuada conocida como MVA representa una de las más fuertes propuestas en la terapia génica, porque sus cualidades, tales como tener un genoma muy grande, expresar gran cantidad de proteínas, presentar una relativa fácil recombinación genética *in vitro* y sobre todo el promover una infección abortiva en las células huésped.

El trabajo que aquí se reporta se basó en la construcción de un vector recombinante, a partir de la cepa atenuada del virus de la Vaccinia, MVA, en cuyo genoma se clonó el gen E2 de HPV 18, el cual codifica para la proteína represora de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, también de HPV. La inserción del gen E2 en el genoma de MVA se realizó por medio de una recombinación genética *in vitro* realizada en células CEF, las cuales se conocen como las únicas células permisivas para una infección productiva con MVA. Los resultados obtenidos de la digestión del DNA de la cepa recombinante MVA-E2, con las enzimas de restricción *Bam HI* y *ASC-1*, mostraron que el gen E2 se insertó en el genoma de MVA, dando una señal (banda) correspondiente a un fragmento de DNA de 920 pb, en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, el cual se identificó como el segmento de DNA que codifica la proteína E2, (figura 5). Una vez que se tuvo la certeza de haber clonado el gen E2 en MVA, el siguiente paso fue el comprobar su expresión *in vitro* y que la proteína recombinante expresada, efectivamente reprimiera la expresión de aquellos genes que estuviesen bajo el control de la región reguladora LCR de HPV. Esto se logró gracias a los ensayos realizados en líneas celulares, las cuales contenían integrada la región LCR y algún gen reportero bajo su control. En el primer ensayo elaborado se utilizó al gen Lac Z (que codifica la proteína β -galactosidasa de *E. coli*). En un primer intento, se transfectaron células C33 con plásmido LCR- β GAL. Los resultados demuestran que efectivamente hay una reducción en la concentración citoplasmática de la enzima, pero esta

reducción no vá mas allá del 18%, además que los resultados no son consistentes (tabla 6), pues el control de células (control negativo) muestra una ligera concentración de la enzima, ésto se debió tal vez a una contaminación en el medio de reacción, o quizá por la coloración inherente del medio (el medio D-MEM contiene rojo de fenol, que al descongelarse y congelarse en repetidas ocasiones da una coloración amarillenta)., en tanto que el control positivo (células transfectadas con el plásmido), que debería representar la concentración más alta de la enzima, se muestra por debajo de aquellas concentraciones de los extractos provenientes de las células infectadas con el virus MVA-E2. Esto se atribuye a una ineficiencia de la transfección, pues cuando se realiza un ensayo de esta naturaleza se deben controlar muchos parámetros que pueden resultar críticos, por ejemplo, el tiempo de transfección, la cantidad del plásmido transfectado, etc. Sin embargo pudo utilizarse el extracto de las células que fueron infectadas con virus MVA como el control positivo, dado que se espera que no exista represión del gen Lac Z, ya que no se produce la proteína E2. De esta manera se graficaron los valores (figura 7), demostrándose una reducción, si no muy sustancial, sí muy significativa para los fines de este estudio. Cabe hacer una aclaración, puesto que los valores obtenidos parecieran no tener correlación entre las 36 y 48 hr, pero ésto es lógico, si se considera que tres días después de la infección, las células *in vitro* terminan su período de vida, ya que el virus se apropia de la maquinaria celular, dirigiendo la síntesis de las enzimas que requiere, evitando de esta manera que las proteínas celulares sean sintetizadas.

Para poder obtener resultados más confiables, se hizo el experimento, utilizando células 3T3-F4 las cuales no necesitaron transfectarse previamente, pues su genoma contiene tanto el gen Lac Z, como la región LCR que lo controla. Los resultados mostraron ser efectivamente más consistentes (tabla

9), aunque la reducción con la máxima dosis viral (400 μ L del concentrado viral) no sobrepasó el 25%, (figura 8) esto se explica, ya que la enzima β -galactosidasa es muy estable y tiene un tiempo de vida muy prolongado, y debe recordarse que antes de que fuesen infectadas las células, la enzima ya se había producido, así que podemos asumir que gran parte de la enzima cuantificada, pertenece al período anterior a la expresión de la proteína E2.

Si se comparan ambos experimentos se podrá observar que en la células 3T3-F4, el tiempo de incubación para desarrollar color, en la reacción colorimétrica, fué menor que el utilizado con los extractos celulares de C33 transfectadas; también al comparar los valores de actividad específica (tablas 6 y 9), se tienen valores superiores en aquellos extractos; esto es indicativo de una pobre expresión de la enzima en aquellas células transfectadas, por lo tanto los resultados del segundo experimento son más fidedignos.

En otro experimento hecho utilizando ahora el gen reportero para codificar la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa, se infectaron células C33 con las cepas virales MVA y MVA-E2, previa transfección de aquellas con el plásmido 863.1, el cual contiene la región promotora LCR y enseguida la secuencia que codifica la enzima CAT. Los resultados mostraron una reducción en la intensidad de la marca correspondiente a la segunda metilación del cloranfenicol, en aquellos extractos provenientes de células infectadas con virus MVA-E2, lo cual significa una reducción en la cantidad de la enzima que transfiere el grupo acetilo (figura 9); en tanto que la intensidad de la señal de la segunda acetilación es muy similar entre los extractos de las células que no se infectaron con alguno de los virus (control positivo de la expresión de la enzima en las células) y los extractos de las células infectadas con virus MVA; esto se esperaba ya que, el virus MVA no produce la proteína E2, mientras que el vector MVA-E2, al infectar las células expresa el gen E2 y , por lo tanto hay

producción de la enzima recombinante, que reconoce su sitio de unión específico en la región promotora LCR. Para observar claramente el efecto de la proteína E2, sería conveniente, aunque prácticamente imposible, el diseñar un ensayo en el cual se supiera el momento exacto en que comienza la expresión de los genes reporteros y calcular el momento para realizar la infección, para dar tiempo al virus de expresar la proteína E2 recombinante, justamente cuando el gen reportero comenzará a expresarse. Sin embargo con los resultados que aquí se reportan, se tiene una excelente visión del efecto regulador de la proteína E2 recombinante *in vitro*; para demostrar entonces que el virus también puede ser efectivo como vector *in vivo*, se recurrió al modelo animal, utilizando ratones desnudos o atímicos, los cuales fueron elegidos por la ventaja que representa no involucrar la respuesta inmune, ya que esta hubiese interferido tanto con la formación de los tumores así como con su crecimiento., como se sabe, el sistema inmune responde ante la presencia de factores que reconoce como extraños, y en este caso particular, la presencia de las células HeLa, con las cuales se indujo la formación de tumores, hubiese sido rechazada y por tanto el crecimiento de los tumores se vería afectado, en el caso de haber elegido ratones normales.

Los resultados de estos experimentos demuestran que en aquellos ratones que fueron inyectados con SSI o con virus MVA, aún recibiendo la misma dosis que los ratones del tercer lote (tratados con MVA-E2), el crecimiento en los tumores llegó a un punto máximo (figura 12), aun que si bien es cierto que después de este punto, al parecer, hubo una disminución en el crecimiento, la explicación que pudiera darse a esto es que los tamaños de los tumores ya eran bastante grandes (tabla 12) para seguir creciendo aún más. En comparación los resultados de los ratones tratados con el virus MVA-E2 muestran que los tumores en estos ratones no crecieron tanto como en los dos

lotes descritos (tabla 12), y a diferencia de estos, tampoco muestran un punto máximo de crecimiento, en cambio, el crecimiento de los tumores siempre se mantuvo constante (figura 11). En cuanto al tamaño de los tumores (tabla 11), las áreas calculadas son siempre mayores, a partir de los primeros 7 días, para aquellos ratones tratados con SSI o con virus MVA, que en los ratones tratados con el virus MVA-E2 (figura 10). Podría pensarse que esta diferencia se debió al tamaño inicial de los tumores, pero cabe aclarar que los ratones se distribuyeron homogéneamente por sus tamaños tumorales (obsérvese que el promedio de las áreas es similar en todos los lotes en el día cero), la diferencia se hizo evidente a partir del día en que los ratones recibieron la primera dosis del respectivo tratamiento (comparese las áreas promedio a partir del 7º día). En el caso de aquellos ratones tratados con SSI, el área total promedio inicial fué un poco mayor que la de los otros lotes; para demostrar que ésto no influyó en los resultados finales se hizo una estadística del crecimiento semanal de los tumores de cada ratón, obteniendo la diferencia entre el área de la última medición hecha hasta el momento de realizar la siguiente medición, y el de la semana anterior a esta última medición. Estas diferencias en los tamaños por cada 7 días se promediaron para cada lote y esto se consideró como un índice del crecimiento semanal. Como se observa en los resultados (figura 11), los ratones tratados con SSI, presentan un crecimiento promedio exagerado a partir del día 14, al igual que aquellos tratados con virus MVA, en cambio los ratones tratados con el vector MVA-E2 presentan un crecimiento semanal promedio muy moderado, donde el punto de crecimiento máximo se dió entre los días 7 y 14, es decir, justo antes de recibir la segunda dosis del tratamiento, después de lo cual se redujeron los niveles de crecimiento con respecto a las dos primeras semanas (comparese el promedio de crecimiento del día 28 con el de los días 7 y 14). En el caso de los otros dos lotes también

hay una disminución en el índice de crecimiento tumoral muy drástico en ambos casos (comparese el día 21 con el día 28). El que hayan dejado de crecer los tumores se puede deber, tal vez al tamaño tan grande que alcanzaron en las primeras semanas (en algunos casos ocupaba totalmente la parte posterior del animal), y cuando se hizo la última medición, las membranas basales de la dermis ya se habían roto y se había llegado a un proceso metastásico (esto se asume, debido a la apariencia necrótica de los órganos internos), es decir, que el tumor avanzó de manera interna, y por esto, en el caso del tratamiento con SSI y virus MVA, no sólo se observa que dejaron de crecer los tumores, sino que parecería que los mismos se redujeron de tamaño drásticamente.

En el caso de los ratones tratados con el virus MVA-E2, la explicación es diferente, pues debe tenerse en cuenta que en ningún caso el aumento de tamaño en los tumores fué tan grande como en los otros lotes, más bien, los índices de crecimiento tumoral se mantuvieron más o menos constantes entre una semana y otra. La disminución en el tamaño promedio de las áreas (entre los días 21 y 28) tiene una explicación diferente a lo dicho anteriormente para los tratamientos con SSI y MVA, pues al no presentar un crecimiento exagerado en las primeras semanas, no hubo proceso metastásico, y por lo tanto no se observaron tejidos necrosados. Lo que aquí ocurrió, fué una reducción efectiva en el ritmo de crecimiento, aunque no una reducción del tumor como tal; así en los casos en cuyos datos reportan una disminución del tamaño tumoral, realmente sucedió un cambio en la consistencia de la masa tumoral, pues hasta antes de recibir la segunda dosis del tratamiento, el tumor era compacto (dureza extrema) y cuando se hicieron las mediciones subsecuentes a la segunda dosis, los tejidos en los tumores se habían relajado, por lo tanto la apariencia de disminución de las áreas tumorales se debió a que

el tejido recuperó su tensión normal; sin embargo los índices de crecimiento semanal, así como las áreas promedio, se muestran sin duda más bajos que en los otros dos lotes de ratones; esto se puede explicar porque al infectar con el virus MVA-E2 a las células HeLa, las cuales contienen integrada la región reguladora LCR y los oncogenes E6 y E7 de HPV 16, comienza la síntesis de proteínas virales y junto con ellas también de la proteína E2 recombinante. Al producirse ésta y encontrarse en el citoplasma, migra hacia el núcleo de la célula en donde encuentra y reconoce su secuencia específica de unión en la región LCR (integrada en el genoma celular de las células HeLa), y por lo tanto impide la transcripción de los oncogenes E6 y E7. Así al no haber síntesis de sus respectivas proteínas no hay mantenimiento del estado transformado y por lo tanto no hay progresión tumoral -o en su defecto, ésta se reduce al mínimo - . Selvakumar et al. (1995) han reportado la vacunación con las proteínas no estructurales de HPV, E1 y E2 ,en conejos con tumores inducidos, presentandose una regresión de los papilomas inducidos por virus (Selvakumar, 1995).

Como puede apreciarse en los diferentes experimentos realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, hay evidencia de represión en la región promotora LCR; un estudio más fino, por ejemplo en los tumores inducidos en los ratones, podría revelar la cantidad de proteínas E6 y E7 presentes en las células antes y después de realizar la infección con el vector MVA-E2. Sin embargo, el fin que perseguía este trabajo era el demostrar que la cepa MVA podría utilizarse satisfactoriamente como vector en casos de CaCU, causado por HPV, y esto finalmente, se ha logrado plenamente, y recordando la hipótesis propuesta, se puede decir que ésta es válida.

Parte del exitoso uso del vector radica en que la expresión en el citoplasma evita problemas relacionados con la ruptura de sitios cripticos, el procesamiento

y el transporte del núcleo al citoplasma (Estrada G, 1992). Por todo lo visto, el virus MVA cuenta con enormes posibilidades para usarse, como un vehículo seguro y eficiente de material genético de otros agentes infecciosos

VI.- CONCLUSIONES.

A partir del análisis de los resultados, se concluyen varios aspectos:

Es factible llevar a cabo una recombinación genética *in vitro* utilizando al virus de la vaccinia para clonar un gen foráneo y esta característica le confiere la probabilidad de ser utilizado como vector. La construcción de un vector con una cepa atenuada del virus de la Vaccinia -llamada MVA- representa ventajas tales como el tener una alta eficiencia de recombinación, alto título viral en infecciones de propagación, una gran eficiencia en la expresión de los genes clonados en su genoma y sobre todo, que al promover una infección abortiva, no existe el riesgo de una propagación viral en las células huésped contiguas a las células infectadas.

La expresión de la proteína E2 recombinante producida por el virus MVA-E2 dentro de las células, es capaz de reprimir la expresión de aquellos genes controlados por la región reguladora LCR de HPV, ocasionando una reducción en el crecimiento tumoral y según reportes, la introducción de las proteínas E1 y E2, a las células transformadas por HPV, pueden inducir la regresión tumoral.

Por las características probadas del vector MVA-E2, su uso en pacientes humanos pudiese ser óptimo, como modelo de terapia genética.

VII.- BIBLIOGRAFÍA .

B

BALDICK, C.J & MOSS, B.;1993, " Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by Vaccinia Virus intermediate stage genes"; J. Virol.:3515-3527.

BERG, J.W.; 1977. "World-wide variations in cancer incidence as clues to cancer origins"; in Origins of Human Cancer, (book A), edited by H.H. Hiatt, J.D. Watson & J.A.Winsten; Cold Spring Harbor Laboratory. USA:15-19.

BISHOP, J.M.; 1982, "Oncogenes"; Sci. Am. **243**:80-92.

BISHOP, J.M.; 1987, "The molecular genetics of cancer"; Science, **235**:305-310.

BOHINSKI, R.C.; 1991, "BIOQUÍMICA"; 5ª edición; Adisson-Wesley Iberoamericana; USA. 289-378.

BROCK, T.D.; SMITH, D.W. & MANDIGAN M.T.; 1987, "Microbiología", 4ª edición, Prentice-Hall Hispanoamericana, México :412-435.

BUCHKOVICH, K.; DYSON, N.; WHYTE, P. & HARLOW, E., 1990, "Cellular proteins that are targets for transformation by DNA viruses"; *Proto-oncogenes* in Cell Development; edited by T. Hunter, (Ciba foundation); England, P 262-284.

C

CAIRNS, J.; 1978. "Cancer: science and society"; W.H. Freeman, USA:65-88

CORNELISSEN, M.T.; BOTS, T.; BRIET, M.A.; JEBBINK, M.F.; STRUYK, A.P.; VANDEN-TWEEL J.G.; GREER, C.E.; SMITH, H.L. & TER SCHEGGET, J.; 1992, "Detection of human papillomavirus types by the polimerase chain reaction and the diferentiation between high-risk and low-risk cervical lessions"; Virchows Arch B cell pathol. **62**:167-171.

COWDRY, E.V.; 1965, "Cancer cells"; W.B. Saunders, USA:276-547

CULLEN, A.P.; REID, R.; CAMPION, M. & LORINCZ, A.T.; 1991, "Analisis of the physical state of different human papillomavirus DNA in intraepithelial and invasive cervical neoplasm"; J. Virol.:606-612.

D

DE CAPRIO, J.A., LUDLOW, J.F., FIGGE, J. et al., 1988, "SV40 large T antigen forms a specific complex whit the product of the retinoblastoma susceptibility gene", Cell **54**:275-283.

DE JONG, P.J; CHEN. C. & GAMES, J.; 1989, "Aplications of PCR for the construction of vector and the isolation of probes". in Current comunications molecular biology (Polimerase Chain Reaction) ; edited by Henry Erlich, Richards Gibbs, Haig Kazazian Jr. A Cold Spring Harbor Laboratory Press., USA:225-236.

DE-THÉ, G.; 1977, "Viruses as causes of some human tumors? Results and prospectives of the epidemiology aproach"; in Origins of Human Cancer, (book B); edited by H.H. Hiatt, J.D. Watson & J.A. Winstein. Cold Spring Harbor Laboratory., Press, USA:1113-1125.

DOLL, R.; 1977, "Incidence of cancer in humans"; in Origins of Human Cancer (book A) edited by H.H. Hiatt, D.J. Watson & J.A. Winsten. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, 1-14.

DOUGLAS, J.F., 1984. "Carcinogenesis and mutagenesis testing"; Humana Press, Clifton, New Yersey (USA):232-331.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CORNELISSEN, M.T.; BOTS, T.; BRIET, M.A.; JEBBINK, M.F.; STRUYK, A.P.; VANDEN-TWEEL J.G.; GREER, C.E.; SMITH, H.L. & TER SCHEGGET, J.; 1992, "Detection of human papillomavirus types by the polimerase chain reaction and the diferentiation between high-risk and low-risk cervical lessions"; Virchows Arch B cell pathol. **62**:167-171.

COWDRY, E.V.; 1965, "Cancer cells"; W.B. Saunders, USA:276-547

CULLEN, A.P.; REID, R.; CAMPION, M. & LORINCZ, A.T.; 1991, "Analisis of the physical state of different human papillomavirus DNA in intraepithelial and invasive cervical neoplasm"; J. Virol.:606-612.

D

DE CAPRIO, J.A., LUDLOW, J.F., FIGGE, J. et al., 1988, "SV40 large T antigen forms a specific complex whit the product of the retinoblastoma susceptibility gene", Cell **54**:275-283.

DE JONG, P.J; CHEN. C. & GAMES, J.; 1989, "Aplications of PCR for the construction of vector and the isolation of probes". in Current comunications molecular biology (Polimerase Chain Reaction) ; edited by Henry Erlich, Richards Gibbs, Haig Kazazian Jr. A Cold Spring Harbor Laboratory Press., USA:225-236.

DE-THÉ, G.; 1977, "Viruses as causes of some human tumors? Results and prospectives of the epidemiology aproach"; in Origins of Human Cancer, (book B); edited by H.H. Hiatt, J.D. Watson & J.A. Winstein. Cold Spring Harbor Laboratory., Press, USA:1113-1125.

DOLL, R.; 1977, "Incidence of cancer in humans"; in Origins of Human Cancer (book A) edited by H.H. Hiatt, D.J. Watson & J.A. Winsten. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, 1-14.

DOUGLAS, J.F., 1984. "Carcinogenesis and mutagenesis testing"; Humana Press, Clifton, New Yersey (USA):232-331.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

DRILLEN, R.; KOEHREN, F. & KIRN, A.; 1981, "Host-range deletion mutant of vaccinia virus defective in human cells"; *Virology*, 3:488-499

DYSON, N., BUCHKOVICH, K., WHYTE, P., HARLOW, E., 1989a, "The cellular 107K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus", *Cell* 58:249-255

DYSON N, HOWLEY PM, MUNGER K, HARLOW E. 1989b, "The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product". *Science*, 243:934-937.

E

ESTRADA, I.; 1992, "Nuevos enfoques en la obtención de vacunas", en *Vacunas Ciencia y Salud*, editado por Alejandro Escobar G., Jose Luis Valdespino G. y Jaime Sepúlveda A., Secretaría de Salud, México:112-116.

F

FENNER, F.; WHITE, D.; 1993, "Virología Médica"; 2ª edición, Prensa Médica Mexicana, México.

FINLAY, C., HINDS, P., FREY, A. & LEVINE, A.J.; 1987, "Mutations that activate p53 transformation with *ras* produce an altered p53 protein that preferentially binds to heat shock protein hsc70", in *Current Communications in Molecular Biology (nuclear oncogenes)*, edited by F. Alt, E. Harlow & E. Ziff. Cold Spring Harbor Press. 126-131.

G

GARCÉS, J.; MASTERNAK, K.; KUNZ, B. & WITTEK, R.; 1993, "Reactivation of transcription from a vaccinia virus early promoter late in infection"; *J. Virol*:5394-5401.

GARCÍA, A.; THIERRY, F. & YANIV, M.; 1988, "Interplay of viral and cellular proteins interaction along the long control region of human papillomavirus 18", *J. Virol.* 62:4321-4327

GARIGLIO, P. y GARCÍA, A.; 1990, "Papilomavirus humanos y cáncer cervico-uterino"; *Adel. Microbiol. Enf. Infecc.* **8**:45-53.

GEORGES, E; CROISSANT, O.; BONNEAUD, N. & ORTH, G.; 1984, "Physical state and transcription of the cotton-tail rabbit papillomavirus genome in warts and transplantable VX2 and VX7 carcinomas of domestic rabbits"; *J. Virol.*:530-538.

GUILLEME, J.C.; SAING, P. & WECHSLER, J.; 1991, "Vaccinia from recombinant virus expressing HIV genes", *Lancet*, 1034-1035.

H

HUNTER, T.; 1984, "The proteins of oncogenes", *Sci. Am.*:**251**, 70-79.

HUNTER, T, 1990, "Proto-oncogenes in cell development", Ciba Foundation Symposium 150, John Wiley and Sons, (Canadá)

HUANGH, J, YEE JK, SHEW JY et al, 1988, "Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells". *Science*,**242**:1563-1566

I

ICHIHASHI, Y.; TAKAHASHI, T & OIE, M.; 1994, "Identification of vaccinia virus penetration protein"; *Virology*, **202**:834-843.

ISHIJI, T.; LACE, M.J.; PARKKINEN, S.; ANDERSON, R.D.; HAUGEN, T.H.; CRIPE, T.P.; XIAO, J.H.; DAVISON, I.; CHAMBOM, P. & TUREK, L.P.; 1993, "Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate in human papillomavirus 16 E6 and E7 oncogene transcription in Keratinocytes and cervical carcinoma cells"; *EMBO*,**6**:2271-2281.

K

KOVACS, G.R.; ROSALES. R.; KECK, J.G. & MOSS, B.; 1994, "Modification of the cascade model for regulation of a prereplicative, late-stage-specific transcription factor"; *J. Virol*;**3443-3447**.

KRONTIRIS, T.G., 1995, "Oncogenes"; New England Journal of Medicine, **33:303-306**.

L

LEE,W.H., SHEW, J.Y., HONG F.D., et al; 1987, " The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity", Nature, **329:642-645**.

LEVINE, AJ et al 1992,"Tumour suppressor genes, the cell cycle and Cancer" in cancer survey. vol. 12, Cold Spring Harbor Press; USA.

LÓPEZ-REVILLA J,et al; 1986, "Biología celular, aspectos fundamentales", 1ª edición. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas; Alhambra, México, **190-197**.

M

MACKETT, M. & ARCHARD, L.C.; 1979, "Conservation and variation in orthopoxvirus genome structure"; J. Gen Virol.; **47, 683-701**.

MACKETT,M.; SMITH, G.L. & MOSS,B.; 1982, "Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector". Proc. Natl. Acad. Sci.;**79:7415-7419**.

MARTIN, SA & MOSS, B; 1976, "mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-)metil from vaccinia virions"; J. Biol. Chem.; **251:7313-7321**.

MOSS, B., 1990, "Poxviridae and their replication"; in fields,edited by B.N. KNIPE, et al; Virology, Raven Press; USA, **2079-2111**

MOSS, B.; 1990, "Regulation of vaccinia virus transcription", Annu. Rev. Biochem.:**59, 661-688**.

N

NELSON, J.H., ADVERETTE, H.E.; RICHART, R.M.;1984, "Dysplasia, carcinoma *in situ*, and early invasive cervical carcinoma. Cancer J for clinicians **34:306-310**

O

ORTH, G.; BREITBURD, F. & FAVRE, M.; 1977, "Papillomaviruses: posible role in human cancer"; in *Origins of Human Cancer* (book C), edited by H.H. Hiatt, J.D. Watson and J.A. Winsten. Cold Spring Harbor, Laboratory; USA, 1043-1063.

P

PERKUS, M.E.; GOEBEL, S.J.; DAVIS, S.W.; JONHSON, G.P.; LIMBACH, K.; NORTON, E.K. & PAOLETTI, E.; 1990, "Vaccinia virus host-range genes"; *Virology*, **179**:276-286.

PIZARRO, E.; 1992, "Los virus de la viruela y de la vaccinia"; en *Vacunas Ciencia y Salud*, editado por A. Escobar G, J.L. Valdespino y J. Sepúlveda.; Secretaría de Salud, México, 267-284.

R

REID, R., CRUM, C.P., HERSCHMAN, B.R., FU, Y..S., BRAUN, L. et al ; 1984, "Genital warts and cervical cancer III. Subclinical papilomaviral infection and cervical neoplasia are linked by espectrum of continuos morphologic and biologic change". *Cancer* **53**:943-948

ROSALES, R.; HARRIS, N.; ANH, B. & MOSS, B., 1994, "Purification and identification of vaccinia virus-encoded intermediate stage promoter specific transcription factor that has homology to eukaryotic transcription factor SII (TF IIS) and an additional role as a viral RNA polymerase subunit"; *J. Biol. Chem.*; **269**: 14260-14267

S

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T.; 1989, "Molecular cloning: a laboratory manual"; 2nd edition, book 1-3; Cold Spring Harbor Laboratory Press; USA.

SARNOW, P., HO, Y., WILLIAMS, J., LEVINE, A.; 1982, "Adenovirus E1b-58 kd tumour antigen and SV40 large tumour antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells". *Cell*, **28**:387-394.

SCHARF, S., 1990, "Cloning with PCR", in PCR protocols, edited by M. A. Innis, D.H. Gelfand, J. J. Sniski & T. J. White; Academic Press, USA, 84.

SELVAKUMAR, R.; BORENSTEIN, L.A.; LIN, Y.; AHMED, R. & WETTSTEIN, F.O.; 1995, "Immunization with nonstructural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus induced papillomas"; *J. Virol.*, 602-605.

SMITH, G.L. & MOSS, B.; 1983, "Infectious poxvirus vectors have a capacity for a least 25,000 base pairs of foreign DNA"; *Gene*, **23**, 21-24

SPEHNER, D.; GILLARD, S.; DRILLEN, R. & KIRN, A.; 1988, "A cowpox virus gene requires for multiplication in chinese hamster ovary cells"; *J. Virol.*; 1297-1304.

SUTTER, G. & MOSS, B.; 1992; "Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes"; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**:10847-10851.

SUTTER, G.; RAMSEY-EWING, A.; ROSALES, R. & MOSS, B., 1994, "Stable expression of the vaccinia virus KIL gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant"; *J. Virol.*:4109-4116.

T

THIERRY, F.; GARCÍA, A.; YANIV, M.; 1987, "Elements that control the transcription of genital human papillomavirus type 18"; *Cancer Cells*, **5**:106-111

THIERRY, F. & YANIV, M.; 1987, "The BPV-1- transacting protein can be either an activator or repressor of the HPV 18 regulatory region"; *EMBO J.* **6**:3391-3396.

TRAGER, L.; 1973, "Lo esencial de la biología molecular", *El Manual Moderno*, México, 144.

V

VOS, J.C.; SASKER, M. & STUNNENBERG, H.G.; 1991, "Promoter melting by a stage specific vaccinia virus transcription factor is independent of the presence of RNA polymerase"; *Cell*, **65**:105-113.

VOUSDEN, K.H.; DONIGER, J.; DI PAOLO, J.A. & LOWY, D.R.; 1988, "The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene"; *Oncogene Res.*, **3**:203

W

WEINBERG, R.A.; 1984, "A molecular basis of cancer"; *Sci, Am.* **249**:26-142.

WEINBERG, R.A.; 1985, "The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus"; *Science*, **230**, 770-776.

WEINBERG, R.A.; 1989; ""The retinoblastoma gene and gene product" in *Cancer Survey*, vol 12, "Tumour suppressor genes, the cell cycle and cancer" edited by A.J. Levine, Cold Spring Harbor Press (1992): 45-55.

WHYTE, P & HARLOW, E.; 1987; "Regions of the adenovirus E1A proteins required for transformation are binding sites for cellular proteins" in *Current Communications in Molecular Biology (nuclear oncogenes)*, edited by F. Alt, E. Harlow & E. Ziff; Cold Spring Harbor Press. 106-111.

WRIGHT, C.F. & MOSS, B.; 1989, "Identification of factors specific for transcription of the late class of vaccinia virus genes" *J. Virol.*, **4224**-4233.

Z

ZUR HAUSEN, H. & GISSMAN, L.; 1980, "Papillomaviruses" in *Viral oncology*, edited by G. Klein, Raven Press, USA.:433-441

ZUR HAUSEN, H. 1986; "Intracellular surveillance of persisting viral infection. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression" *Lancet*, **489**:124

ZUR HAUSEN,H., 1987; "Papillomaviruses in human cancer"
Cancer,**59**:1692-1697.

ZUR HAUSEN, H., 1991;"Human papillomaviruses in the patogenesis of
anogenital cancer"; Virology, **184**:9-13.

ZUR HAUSEN, H. et al, 1994, "Human pathogenic papilloma viruses" in
Current topics in microbiology and immunology, vol. 186, Zur Hausen
(ed),Springer-Verlag, Berlin.

APÉNDICE A.

A) Preparación de CEF

Se colocaron 25 huevos dentro de una campana de flujo laminar de aire estéril (Forma Scienific) y fueron rociados generosamente con etanol al 70%; se hizo a cada uno de ellos una pequeña incisión en el cascarón (del lado de la cámara de aire) y se cortaron con tijeras estériles. La membrana fué retirada y con sumo cuidado se sacó a cada uno de los embriones, extrayéndoles la cabeza y las extremidades, así como las vísceras; los cuerpos de los embriones se colocaron en una caja Petri, conteniendo medio D-MEM, con el objeto de lavar todo posible resto de tejidos de los órganos internos. Una vez que los cuerpos de los embriones fueron lavados se colocaron en una jeringa de 20 ml, presionando por el émbolo para triturar los cuerpos. El macerado se recibió en un tubo cónico para centrifuga de 50 ml (Falcon). Se agregaron 30 ml de tripsina (al 2.5 %) y se incubó durante 5 minutos a 37°C con agitación , y la suspensión de células se hizo pasar através de una gasa estéril doblada en cuatro partes (presionándola) a un recipiente apropiado. Aquí se adicionaron 20 ml de tripsina y se repitieron las condiciones de incubación, al término de la cual, se filtró de manera similar a la anterior, recibiendo el filtrado en otro tubo cónico, siendo centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, al término de los cuales se retiró el sobrenadante y el botón de células se lavó con 15 ml de medio D-MEM suplementado con 5% de SFB. Finalmente se centrifugó nuevamente y el botón de células se resuspendió en 15 ml de medio D-MEM con 10% de SFB. Durante el periodo en que transcurría la última centrifugación, se prepararon 15 frascos para cultivo celular de 150 cm³ (Nuncion), en donde fueron colocados 14 ml de medio D-MEM al 10% de SFB,

e inmediatamente después de que se resuspendió el botón celular, se agregó 1 ml de esta suspensión a cada frasco, con agitación suave. Se dejó incubar por dos días a 37°C , con atmósfera de CO₂ AL 5 %, antes de hacer el siguiente pasaje.

B) Propagación de virus.

Los CEF se infectaron de la manera ya descrita en el caso de los virus de la cepa MVA; en el caso de la cepa recombinante MVA-E2 la propagación se hizo añadiendo las drogas selectivas, Ácido mucofenólico (MPA), Hipoxantina y Xantina al medio, antes de llevar a cabo la infección, para evitar la contaminación con cepa MVA.

C) Preparación de plásmidos para ensayos de β- galactosidasa y CAT.

i) Crecimiento bacteriano.

En tubos de ensayo estériles con tapón de rosca, de 16 x 150, se colocaron 5 ml de medio Luria estéril y se agregó ampicilina al medio (conc. 10 mg/ml). Se inoculó a cada tubo con 200 µl de una suspensión de *E. coli* (cepa XL-1-Blue) y se añadieron los plásmidos, LCR -β-GAL y 863.1 (un plásmido por cada tubo). Los cuatro precultivos se dejaron incubando toda la noche a 28°C con agitación constante.

A la mañana siguiente, una vez obtenido el crecimiento bacteriano, se tomó un mililitro de cada uno de los tubos y se colocaron por separado en tubos viales (Nunc) de 2.0 ml, y se añadió 1 ml de glicerol estéril en cada tubo, de est modo se almacenaron en congelación (-70°C) para su conservación. El resto de los cultivos se colocó respectivamente en cuatro matrces Erlenmeyer de 1 L de capacidad, cada uno de los cuales contenía 500 ml de medio Luria

estéril con ampicilina (conc. 10 mg/ml), permitiendo el crecimiento celular por toda la noche a 37 °C, en agitación.

ii) Obtención de los plásmidos por lisis alcalina

El contenido de cada uno de los matraces del paso anterior, se vertió en tubos para centrifuga de 250 ml de capacidad, para centrifugar su contenido por 10 minutos, a 4°C, a una velocidad de 5000 rpm (centrifuga Sorvall). El sobrenadante fué eliminado y la pastilla resuspendida en 10 ml de la solución I⁸; se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 20 ml de la solución II recién preparada. Se cubrieron los tubos con papel parafilm y fueron invertidos en varias ocasiones, para homogenizar, posteriormente se dejaron en reposo, colocándolos en hielo por 10 minutos. El paso siguiente consistió en adicionar 15 ml de la solución III (helada), cubriendo con un trozo de papel parafilm cada uno de los tubos, y nuevamente se mezclan por inversión, después de lo cual se proporcionó un reposo de 10 minutos en hielo. Posteriormente fueron centrifugados a 5000 rpm, durante 15 minutos con una temperatura de 4°C. Los sobrenadantes fueron transferidos cuidadosamente a tubos cónicos para centrifuga con volumen de 50 ml de capacidad, midiendo cada uno de los volúmenes y agregando seguidamente 0.6 volúmenes de isopropanol. Se mezclaron perfectamente y se dejaron en reposo por 15 minutos a temperatura ambiente. Después fueron centrifugados a 5000 rpm, por 15 minutos y el sobrenadante de cada tubo fué eliminado y las pastillas se resuspendieron en 4 ml de amortiguador TE pH 8.

⁸ La preparación de las soluciones I, II y III de este método se hizo de acuerdo al manual de Maniatis de Biología Molecular y se encuentra en el apéndice B de esta tesis.

iii) Purificación de los plásmidos por el método de gradiente de Cloruro de cesio.

Se agregaron 4 g de cloruro de cesio (CsCl_2) en cada uno de los tubos obtenidos en el paso anterior, junto con 300 μl de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se colocaron en tubos para ultracentrífuga de 5 ml (Beckman), y fueron equilibrados en una balanza analítica. Posteriormente los tubos se dispusieron en un rotor NTV 90 y se centrifugaron utilizando una ultracentrífuga (XL-90), con una velocidad de 85,000 rpm, durante 3.0 horas a 20 °C. Al término del período de centrifugación, se extrajo de cada uno de los tubos la banda del DNA correspondiente a cada uno de los plásmidos, con la ayuda de agujas hipodérmicas. El DNA obtenido se colocó por separado en tubos cónicos para centrífuga de 15 ml de capacidad, y así fuero agregados a acada tubo, 1 ml de TE y 2 ml de 1-butanol, agitando generosamente y eliminando la fase que contenía el bromuro de etidio (de color rosa), repitiendo la operación en aquellos casos en que fué necesario. El contenido restante de los tubos se pasó a membranas de diálisis ("cutoff 8,000", Sartorius), correctamente identificadas, y se dejó dializar durante 1 hora en agitación, contra amortiguador TE, para eliminar trazas de CsCl_2 . El contenido de las membranas se colocó en tubos para microcentrífuga de 1.9 ml de capacidad, a los cuales se les agregó RNAasa (concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a cada tubo, dejando en incubación por 1 hora a 37°C. Terminado el tiempo de esta incubación se agregó proteinasa K (conc.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a cada uno de los tubos, dejando en incubación durante toda la noche. Al día siguiente se nivelaron los volúmenes de cada uno de los tubos y se adicionaron 200 μl de fenol; los tubos fueron agitados vigorosamente con un vórtex, durante 10 segundos, centrifugando después por 5 minutos a 14 000 rpm. La fase acuosa fué recuperada y puesta en otros tubos. Posteriormente se agregaron 25 μl de

NaCl 4 M (conc. final de 0.2 M) y 1 ml de etanol, para lograr la precipitación del DNA, en cada uno de los tubos. Se colocó a -80°C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugó nuevamente 10 minutos a 14,000 rpm; el sobrenadante de cada tubo se eliminó muy cuidadosamente para no tocar el botón del fondo de los tubos, el cual fué secado perfectamente en una centrifuga de vacío, y finalmente los precipitados se resuspendieron en 100 µl de agua (DEPC), y se mantuvieron almacenados siempre a -20°C.

Para verificar la pureza del DNA plasmidico, se analizaron éstos en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

i v) Quantificación del DNA plasmidico.

Se colocaron 2 µl de cada uno de los plásmidos obtenidos en los pasos anteriores en tubos para microcentrifuga, correctamente identificados y se agregaron 398 µl de agua (DEPC). Estas soluciones se leyeron en un espectrofotometro, a una longitud de onda de 260 nm, utilizando como blanco de calibración 400 µl de agua (DEPC).

APÉNDICE B

Medio Luria.

Bacto-triptona (DIFCO)	10 g
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g
NaCl (BAKER)	10 g

Aforar a 1 L y esterilizar.

Agar Luria

Se prepara medio Luria y se agregan 15 gr de agar por litro de medio. Se esteriliza en autoclave, y aún caliente se vierte en las cajas de Petri. Se deja solidificar en una campana de flujo laminar.

Medio Eagle Modificado.

Pesar 3.7 g de NaHCO_3 (BAKER) y solubilizar en 2 L de agua, añadir el contenido de un frasco de 99.8 g de medio D-MEM (preparado comercial para 10 litros, DUBELCCO) sin glucosa ni L-glutamina y con indicador rojo de fenol, agitando constantemente; aforar a 10 L, hasta disolución completa. Ajustar el pH por burbujeo suave de CO_2 , hasta pH de 7.0. filtrar utilizando un equipo de filtración Millipore, usando N_2 , y almacenar a 4 °C.

Acetato de potasio 5 M.

Pesar 760.88 g y aforar a 1 L.

Acetato de sodio 5 M

Pesar 680.42 g y aforar a 1L

Ácido mucofenólico (400 X)

Disolver 10 mg de MPA en 10 ml de NaOH 0.1 N.

Agarosa al 1 %

Pesar 1 g de agarosa en 100 mL TAE (1 X), calentar por tres minutos hasta fusión total en horno de microondas (Sharp); agregar 5 µl de solución de bromuro de etidio (10 mg/ml).

Albúmina Sérica Bovina.

Pesar 10 mg de ASB y disolverla en 10 ml de agua.

Amortiguador de fosfatos pH 7.0

NaH₂PO₄ 60 mM

Na₂HPO₄ 40 mM

KCl 10 mM

MgCl₂ 1 mM.

Aforar a 1L con agua .

Amortiguador de lisis.

Tris-HCl pH 8.0 100 mM

NaCl 100 mM

Tritón X-100 0.5 %

Amortiguador de muestra

Sacarosa 40 %

Azul de bromotimol 2 %

Amortiguador Salino de Fosfatos pH 7.4.

NaCl 120 mM

KCl 2.7 mM

Amortiguador de fosfatos 10 mM

Aforar a 1 L con agua. Ajustar pH 7.4 con HCl 0.1 N. Guardar en refrigeración.

Bromuro de etidio.

Disolver 1 g de bromuro de etidio en 100 ml de agua, guardar en refrigeración en frascos oscuros ó cubiertos con papel aluminio.

Cloruro de calcio 2.5 M.

Pesar 277.49 g y aforar a 1 L.

Cloruro de potasio 3 M.

Pesar 223.68 g de KCl y aforar a 1L.

Cloruro de sodio 4 M.

Pesar 233.76 g de NaCl y aforar a 1L.

Cristal violeta al 0.1 %

Cristal violeta	0.1 g
etanol	20 ml
H ₂ O	cbp 100 ml.

Disolver el cristal violeta en el etanol perfectamente, aforar con el agua hasta 100 ml).

Dodecil- Sulfato de Sodio (SDS) al 10 %.

Pesar 10 g de SDS y aforar a 100 ml con agua destilada.

EDTA 0.5 M.

Pesar 161.1 g de EDTA y aforar a 1 L.

Estreptomina.

Disolver 1 g de estreptomina en 5 ml de agua estéril.

Fosfato dibásico de sodio di-hidratado 1M.

Pesar 178.05 g y aforar a 1L.

Glucosa 1 M.

Pesar 180 g de glucosa y aforar a 1L con agua.

HEPES 1 M.

Disolver 1.6 g de NaCl, 0.074 g de KCl, 0.027 g de Na₂HPO₄·H₂O, 0.2 g de dextrosa y 1 g de HEPES, en un volumen total de 90 ml de agua. Ajustar el p H a 7.05 con NaOH 0.5 N, y entonces ajustar el volumen a 100 ml con agua. Esterilizar esta solución através de filtración en filtro de 0.22 µm. Guardar en alcuatas de 5 ml a -20 °C.

Hidróxido de Sodio 10 N

Pesar 40 g de NaOH y aforar a 100 mL con agua. Guardar bien cerrado en botella de vidrio.

Hipoxantina 670 X.

Disolver 100 mg de hipoxantina en 10 mL de agua.

O-Nitrofenil-β-Galactósido (ONPG)

Disolver 4 mg/ml de ONPG en 0.1 M de fosfato de sodio pH 7.5, (35.61 g/L de Na₂HPO₄ y 31.21 g/L de Na H₂PO₄)

Penicilina.

Disolver 1 g de penicilina en 5 ml de agua estéril.

Reactivo de Bradford.

Disolver 100 mg de azul de Coomasie G250 en 50 mL de etanol al 95% . Agregar 100 ml de H₃PO₄ AL 87%. Diluir la solución hasta 1 L con agua bidestilada. Filtrar en papel Whatman 3 MM.

Sacarosa al 24%, 28%, 32%, 36% y 40%.

Disolver 24, 28, 32, 36 y 40 g de sacarosa en amortiguador Tris-HCl (1mM) pH 8 necesario para 100 ml de cada solución.

Solución I (de lisis alcalina)

Glucosa 50 mM

Tris-HCl pH 8 25 mM

EDTA 10 mM

Solución II (de lisis alcalina)

NaOH 0.2 N

SDS 1%

Solución III (de lisis alcalina)

Acetato de potasio (5 M) 60 ml

Ácido acético glacial 11.5 ml

Agua 28.5 ml

TAE 50 X.

Tris-base 242 g

Ácido acético glacial 57.1 ml

EDTA pH 8 (0.5 M) 100 ml

TE. pH 8.

Tris HCl (pH 8) 10 mM

EDTA 1 mM

Tripsina al 0.25%

NaCl 150 mM

EDTA 0.02%

Tripsina 0.25%

Agua cbp 1L.

Filtrar con unidad Millipore (con filtro de 25 μ m). Guardar a -20°C.

Tripsina 2.5 mg.

Disolver 2.5 mg de tripsina por ml de agua estéril. Guardar a -20°C.

Tris-HCl 2 M pH 7.5, 8 Y 9.

Pesar 242.28 g de Tris -HCl y afora a 1L con agua bidestilada. Ajustar el respectivo pH con NaOH 1 M.

Xantina 40 X.

Disolver 10 mg/ ml de Xantina en NaOH 0.1 N.