

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

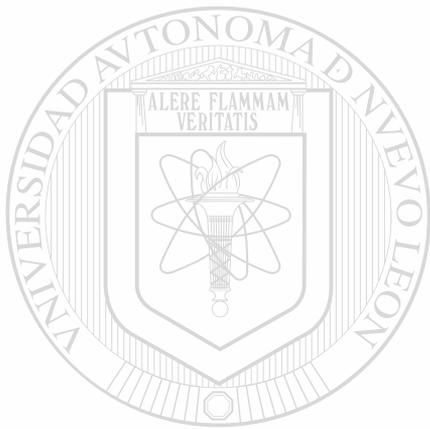


**TERAPIA GENICA PARA EL CANCER
CERVICOUTERINO EN UN MODELO MURINO**

**POR:
Q.F.B. y M.C. IRMA ALICIA MARTINEZ DAVILA**

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

Monterrey, N. L., diciembre del 2004



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IRMA ALICIA MARTINEZ DAVILA

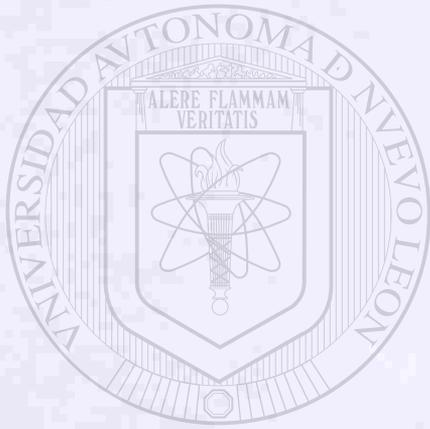
ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
BIBLIOTECAS

TD
RC280
.U8
M37
2004
c.1



1080126536



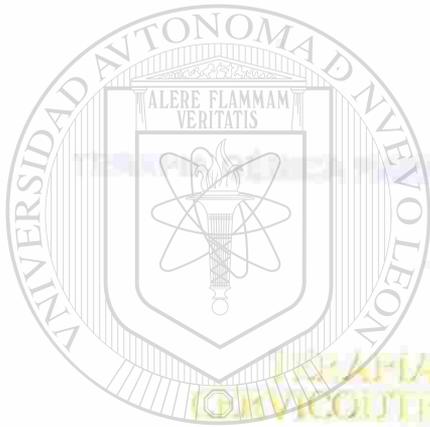
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DR. Q.F.B. y M.C. IRMA ALICIA MARTINEZ DAVILA

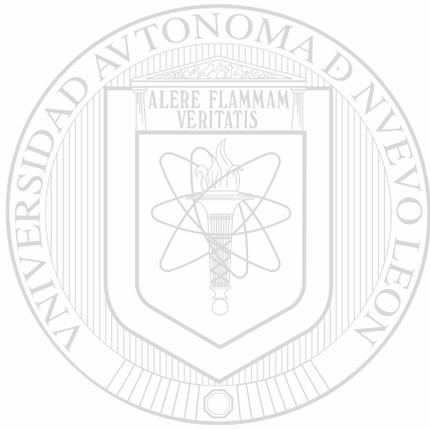
Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biología Molecular e

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética

Monografía de Tesis de Doctorado

Monografía N.º 1, diciembre de 2004





UANL

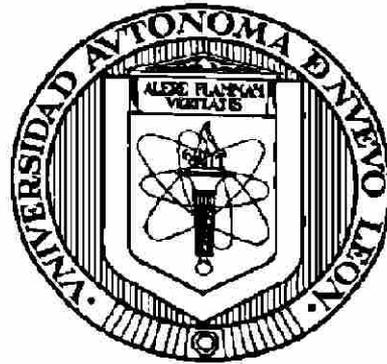
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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



**TERAPIA GÉNICA PARA EL CÁNCER CÉRVICOUTERINO EN UN MODELO
MURINO**

U A N L
POR

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Q.F.B. y M.C. IRMA ALICIA MARTÍNEZ DÁVILA



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

Monterrey, N.L., diciembre del 2004

**TERAPIA GÉNICA PARA EL CÁNCER CÉRVICOUTERINO EN UN MODELO
MURINO**

Aprobación de la Tesis:



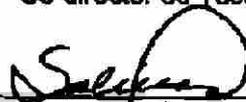
Dr. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

Director de Tesis



Dr. HUGO A. BARRERA SALDAÑA

Co-director de Tesis



Dr. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA

Comisión de Tesis



Dra. AGNÈS REVOL DE MENDOZA

Comisión de Tesis



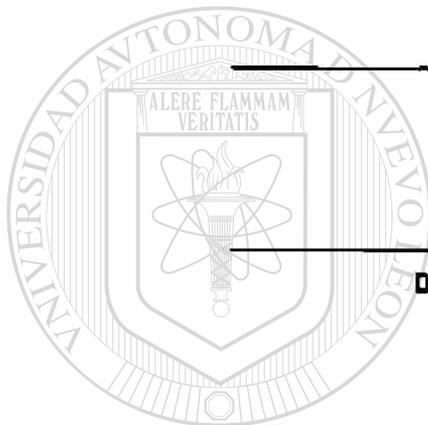
Dra. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ

Comisión de Tesis



Dr. DIONICIO A. GALARZA DELGADO

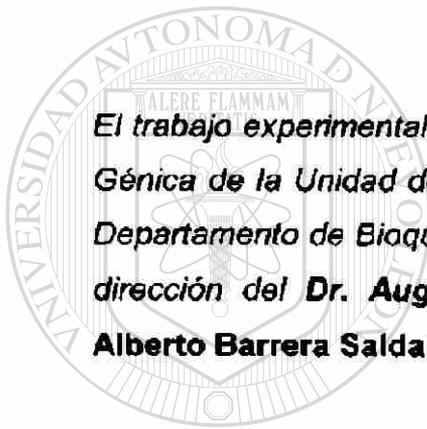
Subdirector de Investigación y Estudios de Postgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





*El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Terapia Génica de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.; bajo la dirección del **Dr. Augusto Rojas Martínez** y la codirección del **Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña**.*

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A Dios, al que todo debo, por haberme dejado coincidir en tiempo y espacio con cada una de las personas que he conocido y por manifestarse en ellas.

A mi amadísima e incomparable familia por apoyar cada una de mis "locuras":

Mis papás, Rosa Elia y Salomón por su infinito amor, comprensión y paciencia. Por los sacrificios que han hecho por verme feliz, por darme libertad para ir en busca de cada uno de mis anhelos. No bastan unas líneas para expresarles mi amor y agradecimiento.

Mis hermanos, Jorge Alberto, Sergio Ariel, Salomón Eduardo y Samuel Gerardo por estar conmigo siempre y compartir este viaje por la vida.....

Mis amados cachitos de cielo, mis pequeños sobrinos Sergio Gael y María Fernanda, por traer como las "estrellitas" un brillo especial a mi vida.

Mis cuñadas Mayra y Mary por la felicidad que han compartido con nosotros.

A mi abuela Alicia..... la eterna "soñadora".

A la memoria de mis abuelos: Dominga, Apolonio y Samuel, a quién lamentablemente, no pude despedir.....

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Augusto Rojas Martínez, mi infinito agradecimiento por su excelente asesoría; por introducirnos al impresionante mundo de la Terapia Génica. Por aceptarme como su "primer" estudiante en el laboratorio. El entusiasmo con que sigue cada uno de los proyectos y el optimismo que irradia realmente son ejemplos a seguir. Gracias por las enseñanzas compartidas....me han ayudado muchísimo. Mi gratitud por su paciencia, comprensión y amistad, por permitirme conocer el lado humano de un investigador. Unas cuantas líneas son insuficientes para decir gracias.

Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña, por permitirme ingresar a la ULIEG y hacerme sentir parte de ella. Por haber brindado apoyo en todo momento para que esta tesis llegara a su fin. Gracias por sus atinados comentarios. Por enseñarnos que las cosas no se hacen a medias y que esta vocación es algo de tiempo completo.... por mostrarnos como se forma un investigador.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona, por estar pendiente del desarrollo de este proyecto y tener siempre las puertas abiertas para ayudar y atendernos con la mejor disposición.

A la Dra. Agnes Revol, mi agradecimiento y cariño por guiar mis primeros pasos en el fascinante campo de la Biología Molecular. Por sus sabias enseñanzas, por estar siempre dispuesta a ayudar y a resolver dudas. Gracias por los acertados comentarios realizados en este trabajo de tesis, me ayudaron muchísimo. Por compartir conmigo mucho más que conocimientos: mil gracias® por su confianza y amistad.

A la Dra. Rocío Ortiz López, por sus consejos, por ponernos siempre los pies en la tierra y dar una solución práctica a los problemas. Por modular y ayudar a resolver las situaciones difíciles que se presentaron durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por su valiosa ayuda.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez, por sus comentarios a lo largo de los diferentes seminarios de evaluación del trabajo de tesis. Por tratar de encontrar siempre la manera de que los proyectos lleguen a finalizarse de la mejor forma posible.

A la Dra. Nancy Elena Guzmán Delgado, del departamento de Patología del Hospital Christus Muguerza, por el análisis histopatológico de los tumores. Por la disponibilidad y dedicación para realizar esta parte del trabajo.

Al personal del departamento de Embriología, muy especialmente a la Dra. Ruth Álvarez por los consejos en el manejo de los animales de experimentación. Al Dr. Carlos de la Garza por las facilidades otorgadas para el uso del bioterio. A Don Francisco Tienda y al Sr. Trinidad Pérez, por cuidar con gran esmero de los ratoncitos. A Norma Palomo y Consuelo García Meléndez por el trato siempre amable.

Al personal del departamento de Microbiología. Al Dr. Rolando Tijerina por darnos las facilidades para usar la ultracentrífuga y obsequiar el análisis microbiológico de las preparaciones adenovirales. A Juanita Niño García y Nora García.

Al Dr. Ricardo Cerda Flores del Instituto de Investigaciones Biomédicas del Noreste, por el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

Al Dr. Luis P. Villarreal por recibirme en las instalaciones del Centro de Vectores Virales de la Universidad de California en Irvine. A Fely Castro por asesorarme en el trabajo realizado durante mi estancia en este laboratorio.

Al Dr. Fernando Enríquez por sus sugerencias. A la Dra. Irma Gabriela Enríquez, Alejandra Gallegos Velasco, Luz Isabel Pérez Rivera y Dr. Miguel Elizondo, por la ayuda prestada.

A Christian Silva y Angel Lugo, mil gracias por compartir mucho de este trabajo. Christian, por trabajar siempre con gran esmero, por el apoyo brindado durante el desarrollo de la tesis; a ti Angel, porque pudimos compartir los primeros intentos de purificación de adenovirus.

A mis entrañables amigos: Iván, Iram, Christian y Claudio por todos los momentos compartidos durante estos años. Creo que nunca encontraré a nadie que les iguale.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A Iván Delgado por su invaluable amistad; por sus consejos y ayuda en las "cosas" del laboratorio y otras más; por las acaloradas y agradables discusiones y por demostrarnos con su entusiasmo la gran vocación que tiene por la investigación.

Al "Pequeño", por ver siempre más allá de lo que los demás ven. Por la inquietud que tiene por explorar todo aquello relacionado con la ciencia. Por compartir conmigo desvelos, inquietudes y demás. Por esperar por mí tantos y tantos días a que terminara mi trabajo para acompañarme a casa; por los interminables días de diversión. Gracias Iram por tu valiosa e incomparable amistad.

A quienes fueron mi apoyo en momentos difíciles: Naika y Marychuy, gracias por su amistad y por olvidarse un poco de sí, para ayudar a los demás.

A mis hermanas, Ana María Sifuentes Rincón y Felipa Castro Peralta, por los largos años de amistad.

A Esther Magdalena Márquez Lona por acogerme amablemente en su casa durante mi estancia en California.

A mis compañeros y amigos de laboratorio con quienes compartí agradables experiencias: Sandra, Dr. Pablo (por su incomparable amabilidad), Virgilio, Alma Rosa (entre otras cosas, por sus divertidas charlas matutinas), Dra. Olivia (por el ánimo), Luis Miguel, Edith y Víctor.

A mis compañeros de la ULIEG durante estos años: el vecinillo Martín, Normis, Mario Iturbe, Lolita Esquivel, Carmen Barboza, Carmen Villalobos, Celia, Eddy, Dr. Andrés, Carlos Vázquez, Martha Fajardo, Mario Flores, Víctor Treviño, Sergio Domínguez, Marisol, Polo, Clarisa, Lety, Lulú, Itzel, Mauricio, Sergio Salazar, Nancy, Prisco, Aurelio, Jorge, Angélica, Ariana, Rafael, Marcos, Juan Carlos, Belarmino, Igor, Nely, Karina, Mireya, Lolis Baños y Alf.

A todo el personal del Departamento de Bioquímica: Alejandra, Vicky, Elsa, Juany, Nancy, Claudia, Sonia, Ruth, Maribel, Eduviges, Gerardo, Blanquita, Mary, Queta, Don Ponchito, Don Pancho; especialmente a Irazema, Raquel, Denise, Paty, Andrés, Don Pedrito y Daniel.

A Norma Sánchez, de Posgrado, por la ayuda brindada durante todos estos años en todo lo concerniente a trámites académicos, por el excelente manejo de esto.

Al inolvidable grupo de Terapia Génica: Iván, Malena, Angel, Christian y Naika.

A mi querido hermano Jorge Alberto por recibirme en su casa durante los últimos tiempos de mi estancia en Monterrey y apoyarme en todo, en todos los sentidos. A Sergio Anaya por su extraordinaria hospitalidad.

A mi familia en Querétaro: Ataúlfo, Celina, Angélica, Flor, Argel, Gustavo, María Luisa, Samuel, Fernando, Abraham, Joel, Ariel, Guillermo, Lenin y Carmen.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por las becas otorgadas para la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VI
NOMENCLATURA	VII
RESUMEN	X
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
2.1. HIPÓTESIS	9
2.2. OBJETIVOS.....	9
2.2.1. Objetivo General.....	9
2.2.2. Objetivos Específicos	10
CAPÍTULO III	
ESTRATEGIA GENERAL	11
3.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL Ad5RSV-HPV16E7	11
3.2. PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVIRALES Ad5RSV-HPV16E7, Ad5RSV-IL2m y Ad5RSV-GMCSFm	12
3.3. OBTENCIÓN DEL MODELO ANIMAL DE CaCU	12
3.4. ESCALAMIENTO DE DOSIS DE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA.....	14

3.5. ANÁLISIS DE CRECIMIENTO TUMORAL	14
3.6. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	14
3.7. PRUEBA DE LINFOCITOS CITOTÓXICOS ANTI-TC-1.....	15
3.8. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS DE LOS TUMORES	15
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	15

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

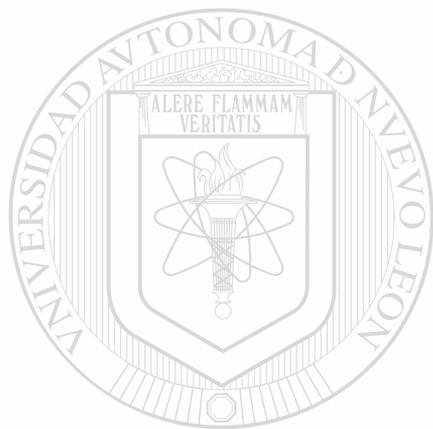
4.1. ORIGEN DE LOS REACTIVOS.....	16
4.1.1. Material biológico.....	16
4.1.1.1. Células tumorales.....	16
4.1.1.2. Vectores adenovirales.....	16
4.1.1.3. Plásmidos.....	17
4.1.1.4. Animales.....	17
4.1.2. Origen del material, reactivos y equipo.....	17
4.1.2.1. Material.....	17
4.1.2.2. Reactivos.....	19
4.1.2.3. Equipo.....	22
4.2. MÉTODOS.....	23
4.2.1. Generación del vector adenoviral Ad5RSV-HPV16E7.....	23
4.2.1.1. Subclonación del DNAC que codifica para la proteína E7 del virus del papiloma humano en el vector acarreador pAd1.1RSV-bpA..	25
4.2.1.2. Cotransfección en células HEK 293 y ensayo en placa	26
4.2.1.3. Identificación del recombinante adenoviral	27
4.2.2. Producción a gran escala y purificación de los vectores de terapia génica	28
4.2.3. Generación del modelo animal.....	32
4.2.3.1. Células tumorales.....	32
4.2.3.2. Implante de células tumorales TC-1 en ratones C57BL/6.....	32

4.2.4. Escalamiento de dosis de vectores de terapia génica.....	33
4.2.5. Terapia génica <i>in vivo</i>	33
4.2.5.1. Grupos Terapéuticos.....	33
4.2.6. Análisis de crecimiento tumoral.....	34
4.2.7. Análisis de supervivencia.....	36
4.2.8. Ensayo de linfocitos citotóxicos anti-TC-1.....	36
4.2.9. Análisis histológico de los tumores.....	38
4.2.10. Análisis estadístico de los resultados.....	39

CAPÍTULO V

RESULTADOS.....	40
5.1. GENERACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL Ad5RSV-HPV16E7.....	40
5.1.1. Subclonación del DNAc que codifica para la proteína E7 del virus del papiloma humano en el vector acarreador pAdl.1RSV-bpA.....	40
5.1.2. Cotransfección en células HEK 293 y ensayo en placa.....	41
5.1.3. Identificación del recombinante adenoviral.....	42
5.2. PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA Y PURIFICACIÓN DE LOS VECTORES DE TERAPIA GÉNICA.....	43
5.3. GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL.....	45
5.3.1. Generación de tumores en ratones C57BL/6.....	45
5.4. ESCALAMIENTO DE DOSIS DE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA.....	45
5.5. EFICACIA DE LA TERAPIA GÉNICA EN EL MODELO ANIMAL DE CÁNCER CÉRVICOUTERINO.....	45
5.5.1. Curva de crecimiento tumoral.....	45
5.5.2. Análisis de supervivencia.....	47
5.5.3. Ensayo de linfocitos T citotóxicos anti-TC-1.....	48
5.5.4. Análisis histopatológico de los tumores.....	49

CAPÍTULO VI	
DISCUSIÓN	50
CAPÍTULO VII	
CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA.....	59



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrategia general.

FIGURA 2: Generación de vectores adenovirales recombinantes.

FIGURA 3: Producción a gran escala y purificación de adenovirus en gradiente doble de CsCl.

FIGURA 4: Caracterización del vector pAdl.1/RSV-bpA E7.

FIGURA 5: Halos de lisis en células cotransfectadas.

FIGURA 6: Identificación mediante PCR del adenovirus recombinante pAd5RSV-HPV16E7.

FIGURA 7: Efecto citopático en células HEK 293.

FIGURA 8: Efecto de los vectores de terapia génica en el modelo animal.

FIGURA 9: Análisis de supervivencia.

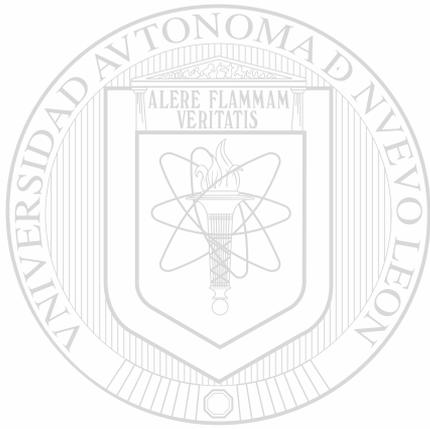
FIGURA 10: Análisis de linfocitos T citotóxicos.

FIGURA 11: Análisis histopatológico de los tumores.

LISTA DE TABLAS

TABLA I. Condiciones de PCR para la identificación del adenovirus recombinante

TABLA II: Cuantificación de partículas virales.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

Ad5	Adenovirus tipo 5
Ad5RSV-HPV16E7	Vector adenoviral que posee el promotor del virus del sarcoma de Rous y que porta la secuencia que codifica para la proteína E7 del HPV tipo 16
Ad5RSV-IL2m	Vector adenoviral que posee el promotor del virus del sarcoma de Rous y que porta la secuencia que codifica para la IL-2 murina
Ad5RSV-GMCSFm	Vector adenoviral que posee el promotor del virus del sarcoma de Rous y que porta la secuencia que codifica para el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos murino.
ANCOVA	Análisis de covarianza
APC	Célula presentadora de antígeno (en inglés)
°C	Grados centígrados
CaCU	Cáncer cérvicouterino
CD 4	Linfocitos CD4
CD 8	Linfocitos CD8
cm	Centímetro
CO₂	Dióxido de carbono
CPE	Efecto citopático (en inglés)
CsCl	Cloruro de cesio
CTL	Linfocitos T citotóxicos (en inglés)
DMEM	Medio mínimo esencial modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico (en inglés)
DNAC	DNA complementario
D.O.	Densidad óptica
DP	Diámetro promedio
DP_{día x}	Diámetro promedio al día de la transducción adenoviral

DP_{día 0}	Diámetro promedio a cualquier día de observación
E6	Gen que codifica la proteína número 6, de expresión temprana del papilomavirus humano.
E7	Gen que codifica la proteína número 7, de expresión temprana del papilomavirus humano.
g	Gramos
GMCSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos murino (en inglés)
h	Horas
HeBS	Amortiguador salino Hepes pH 7.10 (en inglés)
HEK 293	Línea celular de riñon embrionario humano
HPV	Papilomavirus Humano (en inglés)
IL-2	Interleucina 2
kg	Kilogramos
KHCO₃	Bicarbonato de potasio
l	Litro
M	Molaridad
mg	Miligramos
MgCl	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
μl	Microlitro
min	Minuto
mm	Milímetro
MOI	Multiplicidad de Infección (en inglés)
NaCl	Cloruro de sodio
Na₂EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica
NH₄Cl	Cloruro de amonio
NK	Células asesinas naturales (en inglés)
p	Valor de probabilidad

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés)
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (en inglés)
pfu	Unidades formadoras de placa (en inglés)
pH	Logaritmo del inverso de la concentración de hidrogeniones en solución
PNCT	Proporción neta de crecimiento tumoral
p.v.	Partículas virales
RNA	Ácido ribonucleico (en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Promotor del virus del sarcoma de Rous (en inglés)
SD	Solución de diálisis
seg	Segundos
STL	Líneas celulares T de vida corta (en inglés)
TCID50	Dosis infectiva en cultivo de tejidos (en inglés)
TIL	Linfocitos Infiltrantes de Tumor (en inglés)
x	Veces o multiplicación

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Irma Alicia Martínez Dávila
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: diciembre del 2004.

Título del estudio: TERAPIA GÉNICA PARA EL CÁNCER CÉRVICOUTERINO EN UN MODELO MURINO.

Número de páginas: 72

Candidato para el grado de Doctor en
Ciencias con especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética.

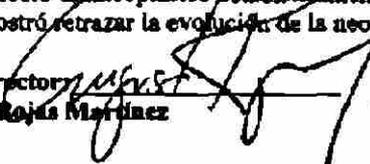
Área de estudio: Terapia Génica

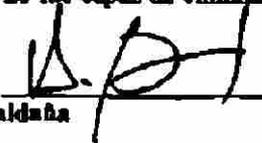
Propósito y método del estudio: La morbi-mortalidad por cáncer cérvicouterino (CaCU) es alta y el tratamiento de esta entidad oncológica es largo, caro, de accesibilidad limitada y muchas veces solo tiene un efecto paliativo. Esto justifica la búsqueda de alternativas terapéuticas que pueda tener un impacto importante en el tratamiento de las pacientes afectadas. En este trabajo se propuso un estudio preclínico de terapia génica antineoplásica mediado por los genes E7 de HPV 16 (proteína antigénica asociada a tumor) y por los genes de las citocinas de origen murino IL-2 y GMCSF.

Se exploró el efecto terapéutico de los adenovirus Ad5RSV-E7, Ad5RSV-IL2m y Ad5RSV-GMCSFm en un modelo murino de CaCU implantado con células singélicas de tumor (línea celular TC-1). Las células se implantaron en el espacio subcutáneo de ratonas C57BL/6. Se formaron cinco grupos experimentales de diez ratonas para ser tratados por separado con los vectores Ad5RSV-E7, Ad5RSV-IL2m, Ad5RSV-GMCSFm, la combinación de Ad5RSV-E7 más Ad5RSV-IL2m, y sólo con la solución de suspensión del vector (control de inyección intratumoral). Se hicieron observaciones del crecimiento tumoral cada tercer día y se estudió la supervivencia de los animales. Se generaron curvas de inhibición del crecimiento tumoral y de supervivencia (10 animales para cada observación). Una vez sacrificadas las ratonas de los experimentos de inhibición de crecimiento tumoral, se estudió la histología de los tumores y la respuesta citotóxica de linfocitos extraídos del bazo en contra de las células implantadas *in vitro* en un ensayo de linfocitos citotóxicos.

Resultados: En estos estudios se encontró que el tratamiento con el vector Ad5RSV-IL2m mostró una respuesta terapéutica, observándose una supresión transitoria del crecimiento tumoral hasta el día 18 de tratamiento, como lo indican las curvas de crecimiento tumoral y el ensayo de CTL. Sin embargo, el efecto terapéutico no se prolongó más allá del día 18. En lo que corresponde a la administración del Ad5RSV-E7, no se observó una respuesta terapéutica significativa al compararse con el grupo control. Igualmente, la combinación de este vector con el vector Ad5RSV-IL2m no mostró sinergia.

Los resultados de este trabajo y modelo animal en particular (uno de los más utilizados en este tipo de estudios), sugieren que de todos los vectores probados en este estudio, el Ad5RSV-IL2m es el único que tuvo un efecto antineoplásico estadísticamente significativo, pues aunque no fue capaz de eliminar el tumor, sí demostró retrasar la evolución de la neoplasia en los ratones tratados.

Firma del Director: 
Dr. Augusto Rojas Martínez

Firma del Co-director: 
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud pública y una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en el mundo. Las estadísticas disponibles a nivel mundial muestran que el cáncer cervicouterino (CaCU) es la quinta causa de muerte por cáncer en las mujeres (1) y que su incidencia en Latinoamérica es particularmente alta. México es uno de los países con la mayor tasa de mortalidad por CaCU (14.4 /100, 000 hab.), solo superado por el cáncer de pulmón en varones (16.1/100, 000 hab.) (2). En los países desarrollados los extensos programas preventivos de citología exfoliativa han reducido la mortalidad por esta patología en más de un 70% (3), pero éstos no han tenido el mismo impacto en los países en desarrollo, donde se estima que las fallas en la detección temprana son responsables hasta de un 60% de la mortalidad por este tipo de cáncer (4). El enfoque terapéutico y el pronóstico para el CaCU dependen del estadio de la enfermedad, el cual se determina por estudios histopatológicos. Estos análisis determinan el grado de la lesión y de la invasión tumoral del epitelio cervical y la diseminación a otros tejidos y órganos. Entre los cinco estadios establecidos, cuyo espectro abarca desde

carcinoma *in-situ* (estadio 0) hasta compromiso a órganos distantes (estadio IVB), tan sólo el estadio 0 es tratado mediante conización en mujeres jóvenes, sin hijos y que desean descendencia. Los otros estadios requieren procedimientos quirúrgicos que abarcan desde la histerectomía total con resección de cúpula vaginal, hasta exenteración pélvica, radioterapia e incluso quimioterapia en estadios avanzados para el tratamiento de las metástasis (5). Desafortunadamente en México, un gran porcentaje de los casos corresponde a estadios avanzados, en los cuales los procedimientos son muy agresivos y el pronóstico es poco favorable. En conclusión, el tratamiento de CaCU es largo, muy costoso, de accesibilidad limitada y muchas veces solo tiene un efecto paliativo. Esta situación justifica la búsqueda de alternativas terapéuticas que puedan tener un impacto importante en el tratamiento y pronóstico de las pacientes afectadas.

En esta búsqueda, la terapia génica surge como una alternativa prometedora. Esta modalidad de tratamiento consiste en la transferencia de ácidos nucleicos, ya sea DNA o RNA, a células de diferentes tejidos para tratar o prevenir una enfermedad (6, 7, 8).

Es importante tomar en cuenta que para lograr una terapia génica exitosa hay muchos aspectos importantes a considerar, tales como el entendimiento claro de la patogénesis de la enfermedad, un tejido blanco apropiado, un gen o genes terapéuticos efectivos, un sistema de liberación génica adecuado y un modelo animal que simule la enfermedad, para realizar los ensayos preclínicos (9).

Así, en el caso del CaCU es posible aprovechar algunos de los conocimientos actuales sobre su biología, con el objeto de obtener una respuesta antitumoral efectiva, selectiva y protectora. Los análisis epidemiológicos para determinar los agentes responsables del CaCU han asociado al Papilomavirus Humano (HPV en inglés) de alto riesgo con esta malignidad, particularmente a las cepas 16, 18, 31 y 45, las cuales también se conocen como cepas oncogénicas o de alto riesgo (3). Estos virus contienen en su genoma dos secuencias codificadoras de oncoproteínas particularmente importantes, denominadas E6 y E7, las cuales son expresadas constitutivamente en células de tumores cervicales (10). Estas proteínas contribuyen a la tumorigénesis cervical al interferir con el control del ciclo celular, promoviendo la inestabilidad genética en las células infectadas (11).

Aunque la respuesta inmune mediada por células juega un papel importante en limitar el crecimiento y promover la regresión de lesiones inducidas por el HPV en el huésped, las células tumorales escapan a la vigilancia inmunológica en algún punto del desarrollo tumoral. Esta respuesta inmune celular puede ser activada por los productos de la expresión génica viral en los tumores inducidos por este tipo de agentes infecciosos, como se ha demostrado para el carcinoma nasofaríngeo inducido por el virus Epstein Barr (12) y para el tumor objeto de este estudio (11).

Con el conocimiento previo, se puede diseñar una estrategia de inmunoterapia antitumoral, la cual si es mediada por vectores de terapia génica, adicionalmente puede tener un efecto localizado en el tejido maligno. Esto

evitaría los efectos secundarios nocivos de la inmunoterapia sistémica observados en el pasado (13,14,15,16,17,18,19). Esta modalidad promisoría amerita ser investigada a nivel experimental.

A continuación se exponen las dos modalidades de inmunoterapia que podrían cooperar en la activación de la respuesta inmune celular (particularmente linfocitos T citotóxicos -CTL en inglés-) y cuyos mejores resultados tal vez se obtengan mediante su aplicación simultánea. También se describen brevemente el vector de terapia génica y el modelo animal que se emplearán para realizar los estudios propuestos.

1.1. Estimulación con Antígenos Específicos de Tumor.

Durante el proceso de transformación maligna, las células tumorales expresan antígenos particulares que no están presentes en el tejido sano del cual se han originado. Estos antígenos surgen como consecuencia de la inestabilidad genética asociada al proceso de transformación maligna o como productos de la expresión de virus oncogénicos. Los antígenos de tumor podrían alertar al sistema inmune, pero la mayoría de los tumores espontáneos logran escapar la vigilancia inmunológica durante su desarrollo. Para el entendimiento de la inmunidad tumoral y el desarrollo de estrategias de inmunoterapia para el cáncer, es fundamental conocer varias características de los antígenos tumorales y de la respuesta inmune contra tumores.

Se ha demostrado que la proteína E7 de HPV-16 (cepa presente en aproximadamente el 50% de todas las lesiones tumorales de CaCU) se

expresa en las lesiones premalignas y tejidos tumorales. En este contexto, se podría utilizar el producto viral E7 de HPV 16, el cual es oncogénico y actúa como antígeno específico de tumor, simultáneamente. Además, se ha demostrado que esta proteína puede funcionar como un antígeno de rechazo de tejido en modelos murinos (20,21). En este mismo producto se han estudiado varios epítopes que cubren casi la totalidad de la proteína. Algunos de estos epítopes son capaces de activar la producción de la respuesta inmune celular (CTL) específica en contra de HPV 16 E7 en el ratón (10) y algunos péptidos de la oncoproteína E7 de HPV 16 se han utilizado en estudios de vacunas terapéuticas contra cáncer cervical de fase clínica I (22). En humanos (pacientes con CaCU y en sujetos sanos) se han identificado epítopes en las proteínas E6 y E7 que generan proliferación de las células T en ensayos *in-vitro*. Estudios preliminares con estos epítopes sugieren una reducción en la respuesta Th1 (linfocinas estimuladoras de linfocitos citotóxicos) en mujeres con displasia cervical y en mujeres con CaCU, en comparación con mujeres sanas, en ensayos de líneas celulares T de vida corta (STL en inglés) (23). Así, la inmunización con antígenos tumorales de pacientes con cáncer puede resultar en una respuesta inmune antitumoral significativa.

1.2. Estimulación con genes para citocinas.

La expresión incrementada de antígenos tumorales en la población tumoral podría ser suficiente para estimular una respuesta inmune tumoricida eficiente; así, el producto E7 descrito podría explotarse por sí solo para intentar generar

una respuesta antitumoral en modelos *in-vivo*, mediante un incremento de su expresión en el tejido canceroso. Sin embargo, ésta también pudiera potenciarse mediante una transducción adicional del tejido tumoral con genes para citocinas del tipo Th1, que estimulan la proliferación y diferenciación de linfocitos T (involucrados en la respuesta citotóxica). En este proyecto se busca la estimulación de los linfocitos T capaces de infiltrar y atacar el tumor, a los cuales se les ha denominado linfocitos infiltrantes de tumor (TIL en inglés- Tumor Infiltrating Lymphocytes-).

Para este propósito se postula el uso de la citocina Th1, interleucina 2 (IL-2) y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, en inglés). Mediante este mecanismo, se puede esperar la activación de linfocitos presentes en el tejido tumoral que generen una respuesta citotóxica (linfocitos T y células asesinas o NK). Esta se realizaría a través de la activación con GM-CSF de las células presentadoras de antígeno (APC en inglés), como las células dendríticas (24) o mediante la estimulación directa con IL-2 de los CTLs (25).

1.3. Adenovirus como vectores de terapia génica.

Hay muchos pasos importantes para una terapia génica exitosa y uno de los pasos más importantes para tal efecto es el uso de un vector apropiado. Los vectores son sistemas que ayudan en el proceso de transferencia de material genético a la célula, facilitando la entrada y biodisponibilidad intracelular del mismo, de tal modo que éste puede funcionar correctamente. En terapia génica

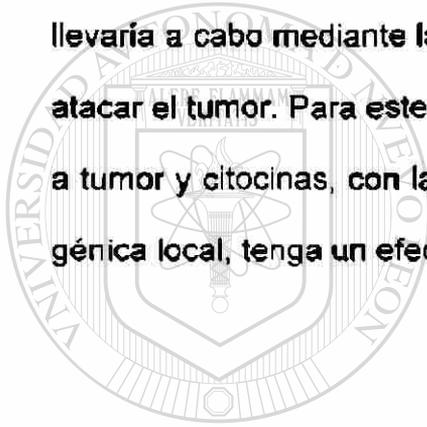
se han utilizado una gran variedad de vectores con fines experimentales, pero de manera general pueden ser clasificados en vectores virales y no virales (6,9,26-29). Dentro de los vectores virales, los vectores adenovirales tienen características que los hacen atractivos para la administración de genes, a las células, debido a que introducen eficientemente DNA en las células huésped, no son inactivados por el complemento *in vivo*, pueden producirse en títulos elevados, son capaces de transducir células diferenciadas y raramente se integran en el genoma celular, reduciendo el riesgo de mutagénesis insercional (30-32). Así, los vectores adenovirales recombinantes deficientes en replicación se han utilizado ampliamente para administrar genes terapéuticos a las células, debido a su capacidad para introducirse en ellas, transferirles su material genético y tomar el control de la maquinaria celular del huésped para sintetizar proteínas virales (33). En este estudio se emplearán como vectores de terapia génica adenovirus recombinantes no replicativos.

1.4. Modelo animal para cáncer cérvicouterino.

El establecimiento de modelos celulares y animales para CaCU ha sido muy complicado, debido a algunas particularidades biológicas de los HPVs humanos de alto riesgo. Destacan su carencia de tropismo para otras especies, un ciclo viral complejo, dependiente de la diferenciación del tejido epitelial, así como una oncogenicidad que requiere de factores intrínsecos particulares. Los estudios preclínicos propuestos se realizarán en un modelo animal inmunocompetente, debido a que la hipótesis de trabajo implica la activación de

la respuesta celular inmune. Para contender con los obstáculos mencionados, utilizaremos la línea celular TC-1, la cual al implantarse vía subcutánea en el dorso de ratones singénicos C57BL/6 produce tumores que expresan los genes E6 y E7 de HPV 16 (34).

Con base en estos elementos, se propuso un nuevo esquema de tratamiento mediado por terapia génica, como un método alternativo al esquema tradicional, y que se postula como menos agresivo. Lo anterior se llevaría a cabo mediante la estimulación de los linfocitos T capaces de infiltrar y atacar el tumor. Para este propósito, se propone el uso de antígenos asociados a tumor y citocinas, con la esperanza de que esta estrategia de administración génica local, tenga un efecto tumoricida.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS.

La reactivación eficiente de la respuesta inmune celular mediante la transducción tumoral con el antígeno específico de tumor E7 de HPV16 y/o las interleucinas IL-2 y GM-CSF, será capaz de generar una respuesta antitumoral suficiente para detener, e incluso eliminar, el proceso maligno en un modelo animal de CaCU.

2.2. OBJETIVOS.

2.2.1. Objetivo General.

Estudiar la eficacia de un tratamiento antitumoral en un modelo para CaCU basado en la activación de la respuesta inmune celular mediante la sobre-expresión de inmunoestimuladores: antígeno específico de tumor del HPV-16 (E7) y linfocinas (IL-2 y GM-CSF). La sobre-expresión de estos inmunoestimuladores se realizará mediante la transducción localizada del tejido tumoral con vectores adenovirales para terapia génica.

2.2.2. Objetivos Específicos.

1. Construir el vector adenoviral Ad5RSV-HPV16 E7.
2. Propagar y purificar los vectores adenovirales Ad5RSV-HPV16E7, Ad5RSV-IL2m y Ad5RSV GM-CSFm.
3. Obtener el modelo animal de CaCU (C57BL/6 implantado con células TC-1).
4. Estudiar la eficacia de la administración intratumoral de Ad5RSV-HPV16E7, Ad5RSV-IL2m y Ad5RSV GM-CSFm., a través del análisis de curvas de crecimiento tumoral, de supervivencia, la respuesta de linfocitos T citotóxicos y el análisis histopatológico de los tumores tratados.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO III

ESTRATEGIA GENERAL

Para estudiar los parámetros claves de la tesis seguimos la siguiente estrategia (Figura 1):

3.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL Ad5RSV-HPV16 E7.

La construcción del vector adenoviral que porta la secuencia que codifica para la oncoproteína E7 del HPV se realizó utilizando la metodología de recombinación homóloga. Se emplearon el plásmido pJM17 (esqueleto del adenovirus tipo 5 que carece de las regiones E1 y E3) y el vector pAd1.1/RSV-bpA-E7 (vector acarreador que tiene regiones de homología con el adenovirus tipo 5); se cotransfectaron ambos vectores en la línea celular permisiva HEK 293 (del inglés- Human Embryonic Kidney), misma que posee la región E1 que permite que el adenovirus se replique, utilizando para ello lípidos catiónicos (lipofectamina). Se identificaron halos de lisis, que se analizaron mediante PCR para comprobar que se trataba del vector adenoviral recombinante esperado. Una vez demostrada la identidad del vector adenoviral, se procedió a la propagación y purificación del mismo.

3.2.PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVIRALES Ad5RSV-HPV16E7, Ad5RSV-IL2m y Ad5RSV GM-CSFm.

Un punto clave para realizar los estudios preclínicos de terapia génica fue el producir y purificar, mediante el paso a través de dos gradientes de cloruro de cesio, los vectores adenovirales para una vez que se tuvieran puros y en un título adecuado, pudieran administrarse en el modelo animal.

3.3.OBTENCIÓN DEL MODELO ANIMAL DE CaCU.

Para obtener el modelo animal de CaCU se emplearon ratonas de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas de edad y la línea celular tumoral TC-1. Se implantaron las células tumorales en el flanco derecho de las ratonas (empleando la dosis de células con la cual el 100% de los animales desarrolló tumor en un período máximo de 15 días) y después de aproximadamente 13-15 días se observó el desarrollo de los tumores.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

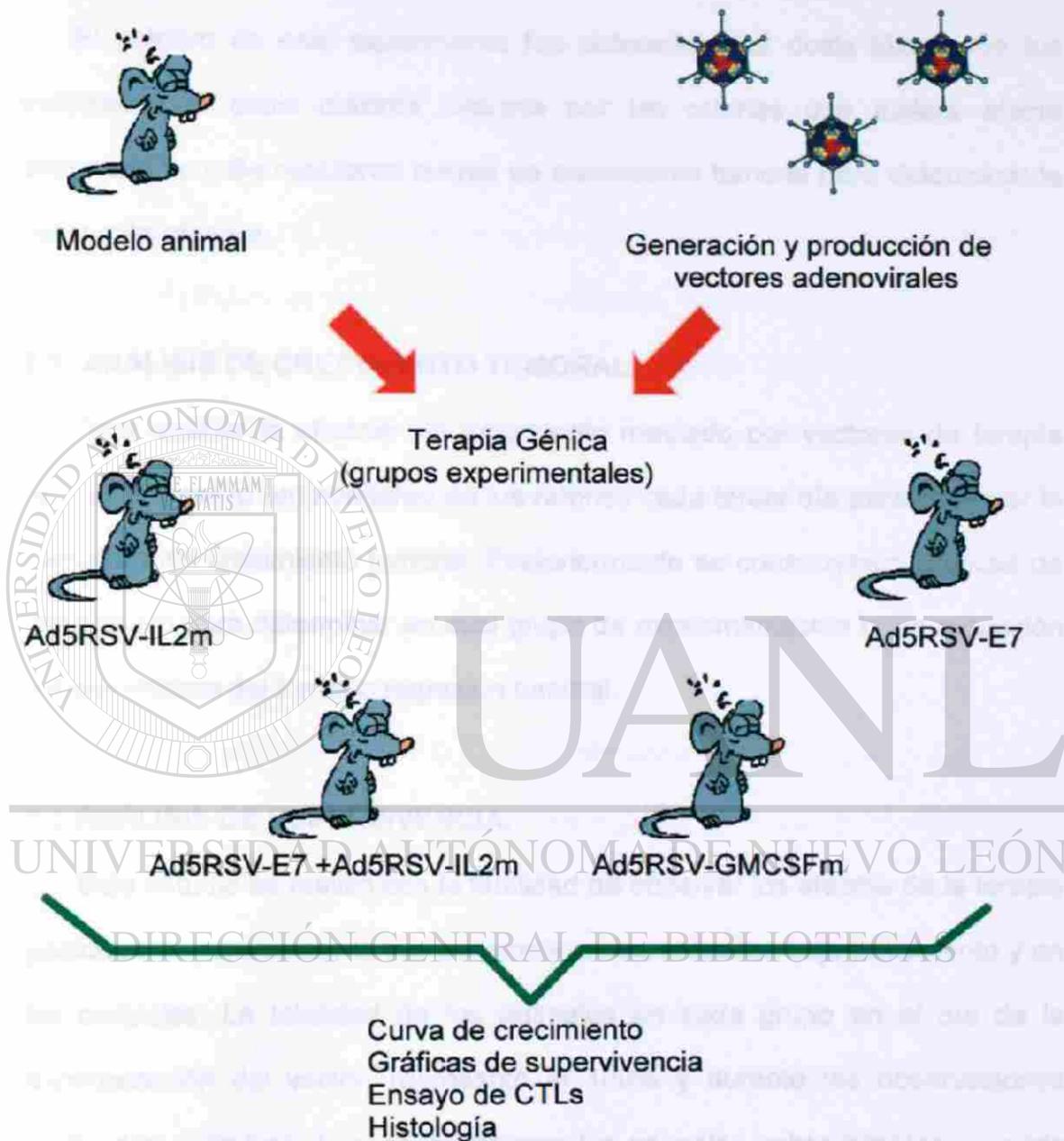


Figura 1. Estrategia General. Después de generar y producir los vectores terapéuticos se llevó a cabo la administración de los mismos en cuatro grupo de animales. A éstos grupos se les administró cada uno de los vectores por separado (Ad5RSV-E7, Ad5RSV-IL2m, Ad5RSV-GMCSFm) y a uno de ellos la combinación del Ad5RSV-E7 más Ad5RSV-IL2m. Posteriormente se construyeron curvas de crecimiento tumoral y gráficas de supervivencia, se realizaron ensayos de linfocitos T citotóxicos y análisis histopatológicos para determinar la efectividad de cada uno de los tratamientos.

3.4. ESCALAMIENTO DE DOSIS DE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA.

El objetivo de este experimento fue determinar las dosis tóxicas de los vectores y la dosis máxima tolerada por las ratonas que tuviera efecto antineoplásico. Se realizaron curvas de crecimiento tumoral para determinar la dosis más efectiva.

3.5. ANÁLISIS DE CRECIMIENTO TUMORAL.

Para evaluar la eficacia del tratamiento mediado por vectores de terapia génica, se realizó un monitoreo de los ratones cada tercer día para observar la evolución del crecimiento tumoral. Posteriormente se construyeron gráficas de crecimiento para determinar en cual grupo de experimentación hubo reducción del crecimiento del tumor o regresión tumoral.

3.6. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.

Este estudio se realizó con la finalidad de observar los efectos de la terapia génica para incrementar la supervivencia en los animales bajo tratamiento y en los controles. La totalidad de los animales en cada grupo en el día de la administración del vector, representó el 100% y durante las observaciones realizadas cada tres días, se registraron los animales sobrevivientes en cada grupo durante los puntos de observación. Con estos datos se construyeron gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier para comparar los efectos de los diferentes tratamientos.

3.7. PRUEBA DE LINFOCITOS CITOTÓXICOS ANTI-TC-1.

Para determinar la generación de respuesta inmune celular inducida por la terapia génica en contra del tumor, se realizó el ensayo de Linfocitos T citotóxicos empleando el agente de óxido-reducción azul alamar. Los esplenocitos extraídos de los bazos fueron aislados y cultivados. Después de la cosecha, los linfocitos obtenidos (células efectoras) se mezclaron en diferentes proporciones con las células tumorales TC-1 (células blanco) mantenidas en cultivo. Luego de un breve tiempo de cocultivo, se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron para determinar la actividad citotóxica (esto de forma indirecta, haciendo la medición de viabilidad celular mediante la adición de azul alamar).

3.8. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS TUMORES.

Los tumores fueron extraídos de las ratonas para ser analizados por el patólogo.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados de los experimentos realizados se analizaron empleando las pruebas estadísticas de ANCOVA, para la comparación de las curvas de crecimiento tumoral y el estudio de linfocitos citotóxicos y el análisis de Kaplan-Meier, para los estudios de supervivencia.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS.

4.1.1 Material Biológico.

4.1.1.1. Células tumorales.

La línea celular tumoral murina TC-1 fue generosamente donada por el Dr. Tzyy-Chou Wu del Departamento de Patología de Johns Hopkins Medical Institution, Baltimore, Maryland y se obtuvo a partir de un cultivo primario de células epiteliales de ratones C57BL/6, cotransformadas con los oncogenes HPV-16 E6 y E7 y c-Ha-ras (34).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.1.1.2. Vectores adenovirales.

Los vectores adenovirales Ad5RSV-IL2m y Ad5RSV-GMCSFm, que portan los genes de origen murino correspondientes a la IL-2 y el GM-CSF, respectivamente, fueron donados por el Dr. Estuardo Aguilar Córdova del Gene Vector Laboratory del Center for Cell and GeneTherapy del Baylor College of Medicine, Houston Texas (CCGT-BCM).

4.1.1.3. Plásmidos.

Los plásmidos que se mencionan a continuación se emplearon para generar el vector adenoviral recombinante Ad5RSV-HPV16E7. El vector pSV2-E7 que porta la secuencia del DNA complementario de la oncoproteína E7 del HPV, fue donado por el Dr. Patricio Gariglio del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN en México, D.F.

Los plásmidos pJM17 (esqueleto del adenovirus tipo 5) y pAd1.1RSV-bpA (vector de expresión que posee regiones de homología con el adenovirus tipo 5) fueron donados por el Dr. Estuardo Aguilar Córdova del CCGT-BCM.

4.1.1.4. Animales.

La colonia de ratones inmunocompetentes de la cepa C57BL/6 fue obtenida de la compañía Harlan (Indianapolis IN, USA). Se emplearon ratonas de 6-8 semanas de edad. Las ratonas fueron mantenidas en una sección del bioterio del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, la cual contaba con las medidas de limpieza para el mantenimiento adecuado de los animales.

4.1.2. Origen del material, reactivos y equipo.

4.1.2.1. Material.

Todo el material de plástico empleado para el cultivo de células eucariotas, fue adquirido de Corning, Costar, Fisher y Biomol .

Corning (NY, USA).

Criotubos 2 ml (430289).

Botella para cultivo celular de 25 cm² (430372).

Botella para cultivo celular de 75 cm² (430725).

Botella para cultivo celular de 150 cm² (430823).

Caja de Petri de 150mm de diámetro para cultivo celular (430599).

Costar (Pittsburg PA, USA).

Pipeta serológica Stripette 5 ml (4487).

Pipeta serológica Stripette 10 ml (4488).

Pipeta serológica Stripette 25 ml (4489).

Plato de cultivo celular de 96 pozos (3585).

Plato de cultivo celular de 24 pozos (3526).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Fisher (Madison WI, USA).

Pipeta serológica Stripette 2 ml (13-678-11C).

Pipeta serológica Stripette 50 ml (13-678-11F).

Axygen (Union City, CA USA).

Puntillas para micropipeta de 10 (T-1536)

Puntillas para micropipeta de 20 (T-300)

Puntillas para micropipeta de 200 (T-200-Y)

Puntillas para micropipeta de 1000µl (T-1000-B)

Tubos para microcentrifuga de 1.5 ml (MCT-150C)

Tubos para microcentrifuga de 0.6 ml (MCT-060-C)

Tubos para PCR de 0.2 ml (PCR-02-C)

4.1.2.2. Reactivos.

Los reactivos utilizados en el mantenimiento, preservación y extracción de DNA de células eucariotas, procariotas y adenovirus empleados en este trabajo se obtuvieron a través de Sigma-Aldrich, Merck, Mallinckrodt, HyClone e

Invitrogen.

Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA).

Aceite mineral

(M-5904).

Acetato de potasio

CH₃COOK (P-5708).

Alcohol etílico.

C₂H₅OH (Merck).

Cloruro de calcio.

CaCl₂ (C-3306).

Cloruro de potasio.

KCl (P-4504).

Cloruro de sodio.

NaCl (S-3014).

Dulbecco's modified eagle's medium

DMEM (D5648).

Dimetil-sulfóxido

DMSO (D-8779).

Duodecil sulfato de sodio

SDS (L-5750).

Fosfato dibásico de sodio.

Na₂HPO₄ (S-0876).

Fosfato monobásico de potasio.

NaH₂PO₄ (S-0751).

Glucosa

C₆H₁₂O₆ (G-5767).

Hidróxido de sodio	NaOH (S-5881).
Sulfato de magnesio.	Mg SO ₄ (M-7506).

Merck (Whitehouse Station NJ, USA).

Alcohol etílico	C ₂ H ₅ OH (159009).
Ácido clorhídrico	HCl (K23178417107).
Formaldehído	HCHO (K29324303).
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃ (K24225494).

Mallinckrodt (St. Louis MO, USA).

Bicarbonato de sodio.	NaHCO ₃ (7396).
Sulfato cúprico.	CuSO ₄ (4848).

Hyclone (Novato CA, USA).

Suero fetal bovino	(SH30070.03).
Suero de ternera bovino	(SH30073.04).

Invitrogen (Carlsband CA, USA).

Agarosa ultrapura	(15510-027).
Lipofectamina	(18324-012).
Tripsina 0.25%	(SH30042.01).

Los reactivos utilizados en el ensayo de linfocitos T citotóxicos y en la generación del vector adenoviral se obtuvieron a través de las siguientes casas comerciales:

Biosource (Camarillo CA, USA).

Alamar blue (DAL1100).

QIAGEN (Valencia CA, USA).

QIAEX II Gel extraction kit (20051).

QIAGEN plasmid midi kit (12143).

QIAGEN plasmid mega kit (12183).

Difco (Detroit MI, USA).

Extracto de levadura (212720).

Bactotripton (211705).

New England BioLabs (Beverly MA, USA).

Enzimas de restricción:

Hind III (RO104S).

Bam HI (RO136S).

Polimerasas:

Taq DNA polimerasa (MO267L).

Enzimas de Modificación del DNA:

T4 DNA ligasa. (MO202S).

Otros.

Cloruro de cesio ICN (Costa Mesa CA, USA)	(813063).
Tubos de polialómero para centrifuga, Beckman	(331372).
Hipoclorito de sodio	(Clorox).
Slide-A-Lyzer, 0.5-3 ml PIERCE (Rockford IL, USA)	(66332).
Tris base USB (Swampscott MA, USA)	(T8600).
EDTA USB (Swampscott MA, USA)	(US15701).
Ácido acético J.T. Baker (Phillipsburg NJ, USA).	(9507).
Bacto-agar Becton Dickinson (Franklin Lakes NJ, USA)	(214010).
Bromuro de etidio Amersham (Piscataway NJ USA)	(US75808).

4.1.2.3. Equipo.

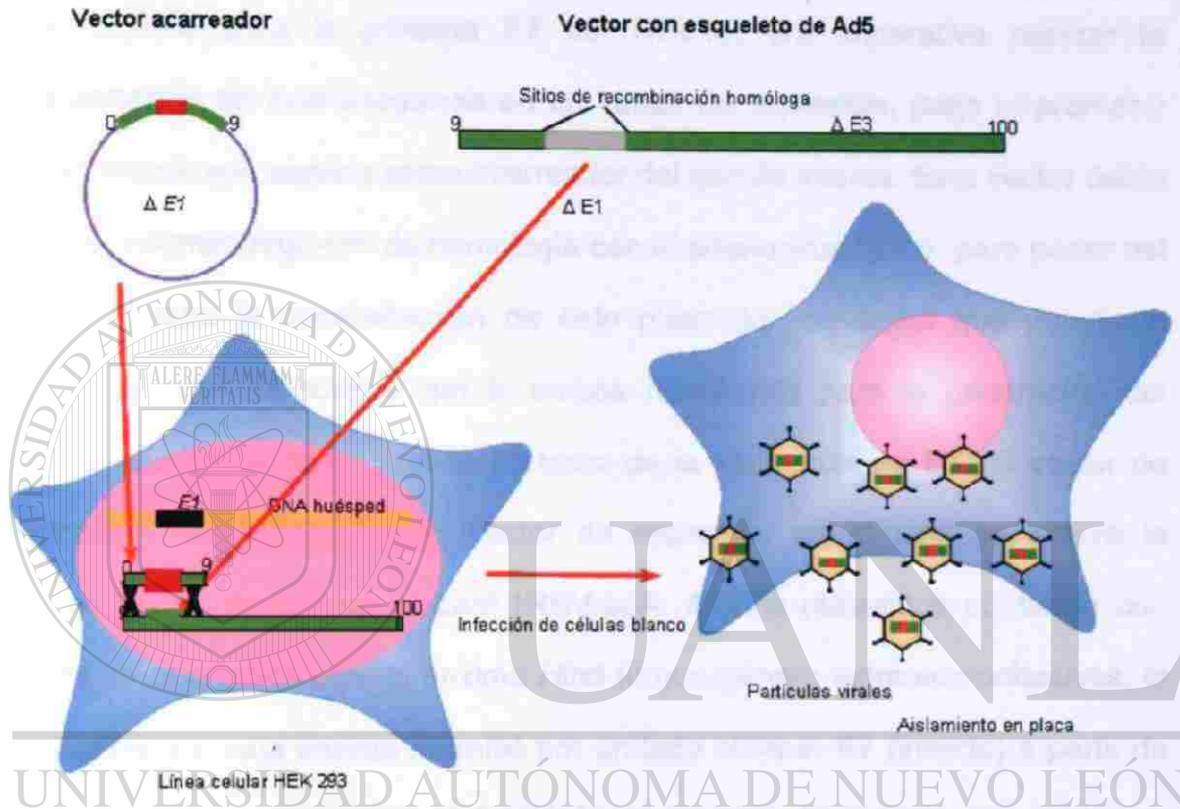
- 1). Cámara de cultivo celular e incubadoras. Se empleó una campana de flujo laminar marca LABCONCO (Kansas City MO,USA) nivel de Bioseguridad II y dos incubadoras a 37 °C con inyección de CO₂ marca Shel-Lab (Cornelius, UK) modelo IR2424 (una para la propagación y mantenimiento de las células eucariotas y otra para el cultivo de virus).
- 2). Microscopio. Se utilizó un invertoscopio marca WUZHOU OPTICAL INSTRUMENT (Wen, China) Mod. XSB-1A.

- 3). Centrifugas y rotores. Se utilizó una centrifuga marca, Beckman (Fullerton CA, USA) modelo TJ6 con rotor de ángulo fijo TA-10, se utilizó una ultracentrifuga marca Beckman modelo L8-M con rotor de columpio SW41Ti.
- 4). Termociclador. Se empleó un termociclador de la marca MJ Research (Waltham MA, USA) modelo PTC-100.
- 5). Cámaras de electroforesis y fuentes de poder. Para el análisis de DNA se utilizaron cámaras horizontales y fuentes de poder marca Biorad (Hercules CA, USA), Wide Mini-Sub Cell GT y Power Pac 300, respectivamente.
- 6). Fotómetro multicanal. Se empleó un lector Multiskan EX Labsystems (Altricham, UK) de paso óptico vertical diseñado para la lectura en microplacas de 8x12 pozos.

4.2. MÉTODOS.

4.2.1. Generación del vector adenoviral Ad5RSV-HPV16 E7.

La construcción del vector adenoviral que porta la secuencia que codifica para la oncoproteína E7 del HPV 16 se realizó utilizando la metodología de recombinación homóloga. Lo anterior consiste en el intercambio de material cromosómico entre secuencias homólogas de DNA; gracias a las regiones de homología existentes entre el plásmido acarreador (que porta el gen de interés) y el vector que posee el esqueleto del Ad5 se efectúa el intercambio de material genético entre ambos, de forma que el gen terapéutico se incorpora al esqueleto adenoviral (figura 2).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 2. Generación de vectores adenovirales recombinantes. Se muestra el proceso por el cual el gen terapéutico se introduce en el esqueleto adenoviral para generar un vector recombinante; se señala en rojo el gen terapéutico, en verde las regiones de homología (entre el vector acarreador y el esqueleto del Ad5) y en gris la región del esqueleto del virus que será sustituida por el gen de interés. El proceso se realiza en la línea celular HEK 293 la cual permite que las partículas adenovirales generadas se repliquen.

4.2.1.1 Subclonación del DNAC que codifica para la proteína E7 del HPV en el vector acarreador pAd1.1RSV-bpA.

Debido a que contábamos con un vector de clonación que poseía el DNAC que codifica para la proteína E7 del HPV16, era imperativo realizar la subclonación de esta secuencia en un vector de expresión, (bajo el promotor RSV) mismo que serviría como acarreador del gen de interés. Este vector debía poseer además regiones de homología con el adenovirus tipo 5, para poder así llevar a cabo la cotransfección de este plásmido con aquel que poseía la secuencia del adenovirus tipo 5; ambos necesarios para la generación del vector adenoviral recombinante portador de la secuencia de E7. El vector de clonación fue pSV2-E7 y el vector de expresión en el cual se realizó la subclonación de E7 fue el pAd1.1RSV-bpA. Ambos plásmidos contaban con sitios de restricción para la enzima *Hind* III que genera extremos cohesivos; la digestión con esta enzima permitió por un lado obtener E7 (inserto) a partir de pSV2 y por otro linearizar pAd1.1RSV-bpA (vector). El inserto y el vector se purificaron y posteriormente se ligaron utilizando la enzima T4 DNA ligasa incubando a 16°C durante toda la noche. La identidad del vector pAd1.1RSVbpA-E7 se confirmó mediante caracterización enzimática con la enzima *Hind* III (para observar la liberación del fragmento incorporado) y adicionalmente realizando secuenciación con el iniciador RSV 372S, que se pega en el promotor RSV del vector acarreador (para confirmar que el fragmento se insertó en la orientación adecuada).

4.2.1.2 Cotransfección en células HEK 293 y ensayo en placa.

Una vez obtenidos el vector acarreador pAdl.1RSV-E7 y el plásmido portador del esqueleto adenoviral (pJM17), se purificaron mediante los estuches de midi y mega prep de Qiagen respectivamente, para así proceder a la generación del vector adenoviral recombinante de interés. La cotransfección se realizó en cajas de Petri de 100 mm con células HEK 293 con un 80-90% de confluencia (mantenidas en DMEM suplementado con 10% de suero de ternera bovino, con menos de 30 resiembras). Para ello se mezclaron 5 µg de vector acarreador pAdl.1/RSV-bpA-E7 y 5 µg de vector pJM17 usando 30 µl de lipofectamina como agente de transfección y 1.3 ml de DMEM sin suero. La mezcla DNA-lipofectamina-DMEM se incubó 45 min. a temperatura ambiente y posteriormente se elevó el volumen de la mezcla a 6.4 ml con DMEM y se puso en contacto con las células durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Después de 24 horas de incubación, la mezcla de transfección fue removida mediante aspiración y la monocapa celular transfectada se cubrió con 10 ml de la mezcla agarosa1%-medio 2X [mezcla a partes iguales de agarosa 1% en agua + DMEM 2X con HeBS (Hepes 20 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, glucosa 6 mM y Na₂HPO₄ 0.7 mM) y suero de ternera al 10%]. Se incubaron las cajas nuevamente a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 10-14 días. Las placas se revisaron cada 1-3 días. Cada 4-5 días se alimentaron los cultivos con 10 ml de mezcla agarosa1%-medio 2X. Después de 14 días de incubación se identificaron halos de lisis, los cuales fueron recolectados mediante succión con ayuda de una punta de 1 ml (recortada en su extremo inferior) y colocados

en un tubo de 1.5 ml con 1 ml de DMEM; el trozo de agarosa fue disgregado y se tomó una alícuota que se analizó mediante PCR para comprobar que se trataba del vector adenoviral recombinante esperado. El resto de la muestra se congeló a -80°C hasta su uso. Una vez demostrada la identidad del vector adenoviral se procedió a realizar la clonación y producción a gran escala del mismo.

4.2.1.3. Identificación del recombinante adenoviral.

Para realizar este análisis se recolectaron todas las placas de lisis obtenidas (de la forma descrita en el apartado anterior) para determinar la presencia del inserto mediante PCR, empleando los iniciadores RSV 372S (5' acgccatttgaccattcacc 3') y E73' (5' ttgtaocgcacaaccogaagcgtaga 3') que se aparean al extremo 5' del promotor RSV y en la región 3' de E7, respectivamente). El iniciador E73' empleado para este fin, se diseñó según la secuencia del HPV tipo 16 (gi:19908856). y el iniciador RSV 372S fue diseñado en BCM. Las condiciones para efectuar la PCR se muestran en la tabla I.

Tabla 1. Condiciones de PCR para la identificación del adenovirus recombinante. Se muestran las condiciones empleadas para amplificar el fragmento de 259 pb, que evidencia a el vector adenoviral recombinante que porta la secuencia que codifica para la proteína E7.

REACTIVOS	VOLUMEN (μl)
Agua Milli Q	9.4 μl
Buffer para PCR 10x	1.6 μl
MgCl ₂ 25 mM	1.6 μl
dNTPs 2.5 mM	0.2 μl
Taq polimerasa 5U/μl	0.2 μl
Iniciador RSV 372 S 5 μM	1.0 μl
Iniciador E7 3' 5 μM	1.0 μl
DNA	1.0 μl
VOLUMEN TOTAL	16.0 μl

4.2.2. Producción a gran escala y purificación de los vectores de terapia génica.

La producción a gran escala, purificación y cuantificación de los vectores para pruebas preclínicas se realizó como se enuncia a continuación (figura 3). Para propagar y purificar cada uno de los vectores adenovirales de terapia génica se sembraron 100 cajas de Petri de 150 mm con células HEK 293. Cuando las células alcanzaron un 70-90% de confluencia se transdujeron a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 (esto es, 10 p.v./célula), con el sobrenadante conteniendo el adenovirus recombinante resuspendido en DMEM con suero de ternera al 2%. Las cajas se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂ y

95% de humedad relativa, hasta que el efecto citopático (CPE) fue del 100% (generalmente dos días después de la infección). El contenido total de cada caja de 150 mm fue recolectado y centrifugado y posteriormente la pastilla celular recuperada se resuspendió en un volumen mínimo de medio, que luego se sometió a 3 ciclos consecutivos de congelación a -80°C y descongelación a 37°C ; los virus contenidos en el lisado celular se recuperaron y se purificaron en un doble gradiente de cloruro de cesio, tal y como se describe a continuación (35).

El sobrenadante del vector adenoviral recombinante se depositó en la superficie de un gradiente discontinuo 1.2g/l-1.4g/l de cloruro de cesio. Las muestras fueron centrifugadas durante 90 minutos a 4°C a 35 000 rpm en un rotor SW41Ti. Con ayuda de una pipeta Pasteur se recolectó la banda inferior del gradiente (correspondiente a las partículas virales completas), la cual se colocó en la superficie de un gradiente continuo de 1.35 g/L de cloruro de cesio. Las muestras se centrifugaron durante 18 horas a 35 000 rpm a 4°C . Nuevamente la banda se extrajo del gradiente, se colocó en un cassette de diálisis (Slide-A-Lyzer) y se dializó primero contra una solución de Tris 10 mM, MgCl_2 1 mM y NaCl 140 mM pH 7.5 y posteriormente contra una solución que además de los componentes anteriores contenía glicerol (10%). Esto durante un periodo de 3 h a 4°C reemplazando la solución al término de cada hora. Finalmente la solución conteniendo el virus se extrajo del cassette de diálisis por punción, se hicieron alícuotas que se depositaron en crioviales y se conservaron a -80°C hasta su uso (36).

Posteriormente en cada preparación viral se cuantificó el número de partículas virales y la dosis infectiva 50 en cultivo de tejidos, TCID₅₀ (del inglés Tissue Culture Infectious Dose) (35,37). El primer método de cuantificación se basa en la evaluación de partículas virales (p.v.) en solución con respecto a su contenido de DNA; la preparación viral se sometió a lisis en un buffer que contenía 0.1% de SDS, 10 mM de Tris.HCl [pH 7.4], 1mM EDTA y se calentó a 56 °C durante 10 min, para posteriormente leer la D.O. a 260 nm. Una vez realizado esto, se procedió a efectuar la determinación del título del stock viral multiplicando la absorbancia por el factor de dilución apropiado y el coeficiente de extinción (1.1×10^{12} virus por unidad de D.O._{260 nm}):

$$\text{p.v./ml} = (\text{D.O.}_{260 \text{ nm}}) \times (\text{dilución viral}) \times (\text{dilución de la cuveta}) \times 1.1 \times 10^{12}.$$

En la TCID₅₀ se hicieron diluciones de la preparación viral, se pusieron en contacto con células HEK 293 cultivadas en placas de 96 pozos en DMEM con suero fetal bovino al 2% y después de 10 días de incubación a 37 °C con 5% de CO₂, se determinó bajo el microscopio la presencia o ausencia de efecto citopático en cada pozo. Se determinó la proporción de pozos positivos por cada hilera de la placa de titulación; finalmente el título se determinó usando el método estadístico de Karber, en donde por 100 µl de la dilución el título es igual a TCID₅₀/ml = $10^{1+d} (s-0.5)$

donde d = Log₁₀ de la dilución

S = La suma de proporciones (iniciando siempre de la primera dilución)

Adicionalmente se realizaron pruebas de esterilidad con pruebas microbiológicas tradicionales para asegurar que las preparaciones estaban libres de bacterias y hongos.

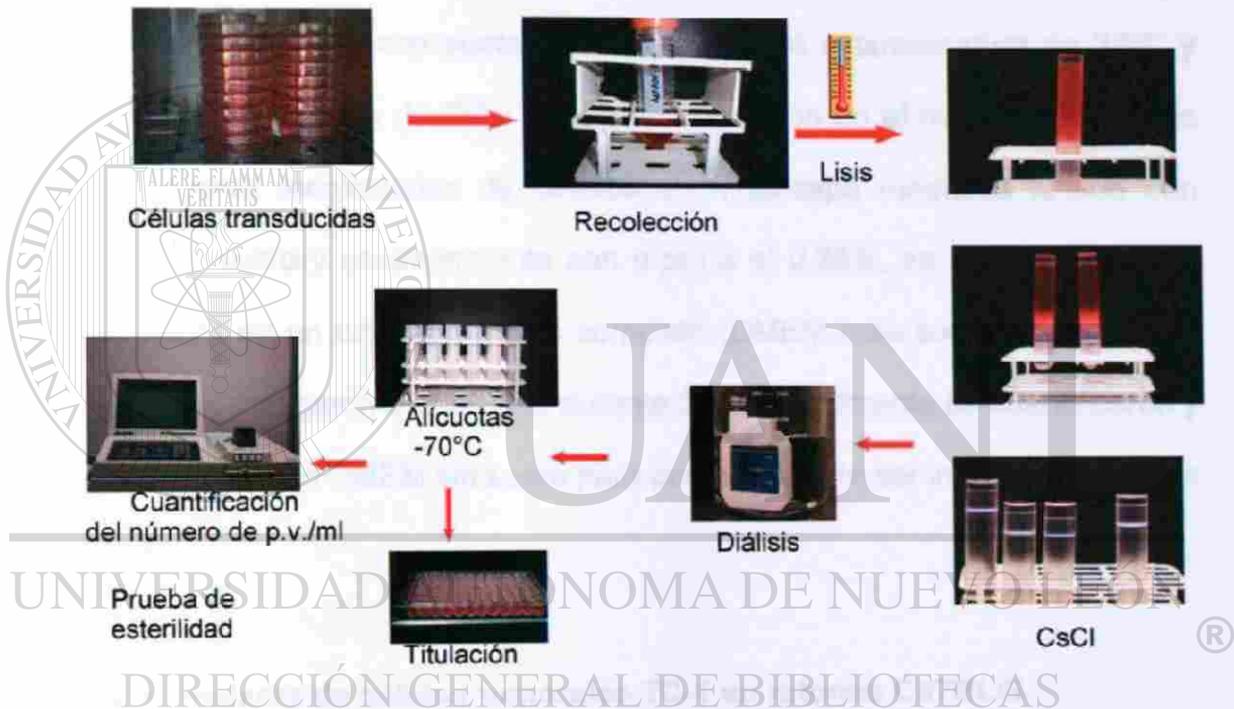


Figura 3. Producción a gran escala y purificación de adenovirus en gradiente doble de CsCl. Se observa el proceso por el cual se produjo y purificó los vectores adenovirales a través de un gradiente discontinuo (en el cual se observan dos bandas, la superior corresponde a partículas virales inactivas y la inferior a partículas virales activas) y uno continuo de CsCl (banda blanca que corresponde a las partículas virales activas). Una vez purificada, la preparación viral se cuantificó y sometió a pruebas de esterilidad para luego ser administrada en el modelo animal.

4.2.3 GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL.

A continuación se describe el proceso de generación del modelo tumoral animal propuesto para los estudios *in-vivo*.

4.2.3.1. Células Tumorales.

Las células TC-1 se mantuvieron en condiciones de cultivo utilizando medio DMEM suplementado con suero de ternera al 10% a temperatura de 37°C y una atmósfera con 5% de CO₂. Para la implantación en el modelo *in-vivo*, las células fueron recolectadas de cultivos en monocapa mediante lavado con DMEM sin suero y un tratamiento con tripsina al 0.25%, se cosecharon y se recuperaron en un tubo con medio completo (DMEM más suero de ternera al 10%), se centrifugaron a 2000 rpm durante 3 min. Finalmente se cuantificaron y resuspendieron en DMEM sin suero para posteriormente ser implantadas en las ratonas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



4.2.3.2. Implante de células tumorales TC-1 en ratones C57BL/6.

En un experimento previo se determinó el número de células requerido para generar tumores de 5 mm de diámetro mayor, de forma tal que se implantaron de forma subcutánea 5×10^5 células (resuspendidas en DMEM sin suero) en el flanco derecho de cada roedor utilizando un volumen de inyección de 100 μ l. Se realizaron inspecciones de las ratonas implantadas cada dos días para ver su estado de salud y determinar el progreso del tumor.

4.2.4. Escalamiento de dosis de vectores de terapia génica.

Para poder iniciar los experimentos de terapia génica *in vivo* fue necesario determinar las dosis tóxicas de los vectores y la dosis máxima tolerada por las ratonas que tuviera efecto antineoplásico. Para ello se probaron la siguientes dosis de cada uno de los vectores: 1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{11} y se realizaron curvas de crecimiento tumoral para determinar la dosis más efectiva. Una vez determinada ésta, se procedió a realizar los estudios de terapia génica propuestos.

4.2.5. Terapia génica *in vivo*.

Los animales implantados con células tumorales se dividieron en dos grupos, cada grupo constó de 20 ratonas; diez para curvas de crecimiento tumoral y otros diez para análisis de supervivencia.

4.2.5.1. Grupos Terapéuticos.

Una vez que se establecieron tumores de aproximadamente 5 mm de diámetro mayor, las ratonas se anestesiaron con pentobarbital (17 mg/kg). El vector adenoviral se administró mediante la inyección de 20 μ l de la dilución adecuada, directamente en el tejido tumoral, utilizando una jeringa Hamilton de 100 μ l de capacidad equipada con una aguja G 27. La administración de los vectores se realizó en 20 ratonas por grupo, de las cuales diez entraron al protocolo de estudio de evolución tumoral y análisis histopatológico y se sacrificaron 24 días después de la administración del vector. Las diez ratonas

restantes de cada grupo entraron al protocolo de análisis de supervivencia. Los grupos terapéuticos ensayados fueron los siguientes:

1. Inmunoestimulación con Ad5RSV-HPV16-E7.
2. Inmunoestimulación con Ad5RSV-mIL-2.
3. Inmunoestimulación con Ad5RSV-mGM-CSF.
4. Inmunoestimulación con Ad5RSV-HPV16-E7+Ad5RSV-mIL-2
5. Solución de diálisis (solución de suspensión de los vectores adenovirales) como control para efectos antitumorales de la inyección intratumoral.

4.2.6. Análisis de crecimiento tumoral.

La evolución del crecimiento tumoral se monitoreó cada tercer día con ayuda de un calibrador tipo Vernier, midiendo el diámetro mayor y menor del tumor. Con los datos obtenidos, se determinó el volumen tumoral con la fórmula empleada para calcular el volumen de un elipsoide (38-41):

$$\text{Volumen} = m_1^2 \times m_2 \times 0.5236$$

donde m_1 = diámetro menor

m_2 = diámetro mayor

Se determinó el crecimiento de los tumores en los animales de la siguiente manera. Con los valores de los diámetros mayor y menor del tumor se determinó un diámetro promedio (DP) para cada observación puntual, como se indica en la fórmula 1:

Fórmula 1

$$DP = (\text{diámetro mayor} + \text{diámetro menor}) / 2$$

En el análisis del crecimiento tumoral, los datos recolectados en cada observación ($DP_{\text{día } x}$) se dividieron por el valor del DP al día de la transducción ($DP_{\text{día } 0}$) y se multiplicaron por 100 para obtener el índice de crecimiento relativo o ICR (ver fórmula 2). Los valores del ICR de cada tumor en cada punto de la observación se promediaron para cada grupo de tratamiento y se determinaron los errores estándares.

Fórmula 2

$$ICR = (DP_{\text{día } x} / DP_{\text{día } 0}) \times 100$$

Para los estudios de eficacia antineoplásica, se agruparon y promediaron los ICR de los animales pertenecientes a los grupos tratados con los vectores terapéuticos y con el vector control. A este ICR se le restó 100 para obtener la proporción neta de crecimiento tumoral o PNCT (ver fórmula 3) en cada punto de la observación y se determinaron los promedios y errores estándares para cada grupo. Con estos datos se construyó la curva de crecimiento para analizar la eficacia de cada uno de los tratamientos (determinar si en los grupos de experimentación hubo reducción del volumen del tumor o regresión tumoral).

Fórmula 3

$$PNCT = ICR_{\text{día } x} - 100$$

4.2.7. Análisis de supervivencia.

En este estudio, se repitió el experimento anteriormente descrito, pero los animales no se sacrificaron y se determinó la supervivencia de cada uno hasta que estuviera en malas condiciones generales o cuando el tumor alcanzaba un diámetro mayor a 2.5 cm, difícil de ser tolerado por la ratona. Con los datos de supervivencia de cada animal se realizó una curva de Kaplan-Meier para analizar la eficacia de la terapia génica para prolongar la supervivencia en cada modelo de implantación.

4.2.8. Ensayo de linfocitos citotóxicos anti-TC-1.

Para determinar la generación de respuesta inmune celular inducida por la terapia génica en contra del tumor, se realizó el ensayo de Linfocitos T citotóxicos empleando el agente de óxido-reducción azul alamar (42, 43). Los ratones implantados sometidos a tratamiento se sacrificaron mediante dislocación cervical el día 24 después de la administración del vector de terapia génica. Inmediatamente después del sacrificio en la campana de flujo laminar en condiciones de estricta asepsia se extrajeron los bazos de 3 ratonas de cada grupo de implantación y tratamiento. Se procedió de la misma manera con los controles no tratados (ratonas de la misma edad no implantadas con el tumor y no tratadas con vectores de terapia génica, ratonas implantadas con tumor a las cuales solo se les administró solución de diálisis). Después del sacrificio, los animales fueron sumergidos en un vaso con etanol al 70% e inmediatamente introducidos a la campana de flujo laminar en donde con

ayuda de instrumentos quirúrgicos esterilizados se extrajeron los bazos de cada una de las ratonas. Los bazos se colocaron en una caja de Petri con 3 ml de DMEM, se lavaron y se cambiaron a otra caja con DMEM fresco. La extracción de linfocitos se realizó como sigue, se colocó el bazo sobre una malla de acero inoxidable y con ayuda del émbolo de una jeringa de 5 ml se maceró muy suavemente el bazo de forma que al final se quedó la cápsula casi intacta en la superficie de la malla y los acúmulos de células que pasaron a través de ella se recuperaron en DMEM. Con ayuda de una jeringa se tomó la suspensión y se disgregaron los acúmulos celulares aspirando y regresando la suspensión a la caja varias veces. Inmediatamente después se pasó a un tubo cónico de 15 ml y se lavó un par de veces con DMEM con 5% de suero fetal bovino. Como la solución contenía una gran cantidad de eritrocitos, se resuspendió en una solución de lisis (0.15 M de NH_4Cl , 1 M de KHCO_3 y 0.1M de Na_2EDTA pH 7.4) y se incubó 5 min. a temperatura ambiente con agitación ocasional. Después de la incubación se llenó el tubo con medio y se centrifugó a 1200 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se repitió la operación anteriormente descrita y se resuspendió en DMEM para proceder a la cuenta de células.

El día previo al ensayo, se realizó una resiembra de células TC-1 (1×10^4 cels/pozo en 50 μl de medio) que serían utilizadas como células blanco a una confluencia aproximada del 70%. El día del ensayo las células efectoras (linfocitos) y las células blanco (TC-1) fueron mezcladas en proporciones de 100:1, 50:1, 25:1 y 12.5:1 en una placa de 96 pozos para cultivo celular, de fondo redondo (por triplicado). En paralelo se colocó en una serie de pozos

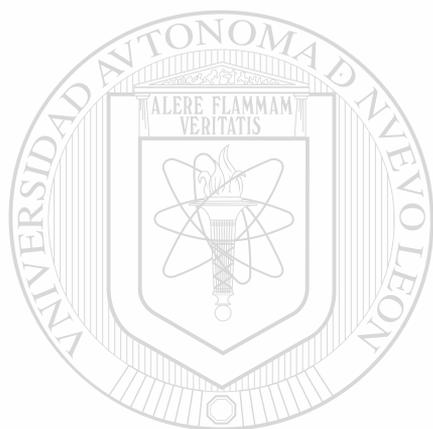
únicamente células blanco y en otra células efectoras (para la medición del ruido de fondo) .Tres pozos se llenaron con células TC-1 sin linfocitos (lisis espontánea), 3 pozos fueron llenados con células TC-1 tratadas con el detergente Tritón al 1% (para referencia del valor de lisis total) y otros tres con medio únicamente. Las células se colocaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y se incubaron durante 4 h. Después de este período se adicionaron 10 µl de azul alamar a cada uno de los pozos. Las placas se regresaron a las condiciones de atmósfera y temperatura mencionadas por un período de 16 h. Luego de la incubación las placas fueron leídas en un lector (Multiskan EX) con un filtro de excitación de 570 nm y uno de emisión de 600nm. Finalmente, se determinó el porcentaje de lisis específica. Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.2.9. Análisis histológico de los tumores.

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, 24 días después de la transducción con los vectores adenovirales (para este día los animales comenzaban a mostrar signos de mal estado general), se les extrajo el tumor y el bazo (para análisis de histología y ensayo de linfocitos T citotóxicos). El tejido tumoral se fijó en formaldehído al 4% (en PBS), se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4µm, los cuales se tñieron con hematoxilina y eosina. Posteriormente las laminillas de histología fueron analizadas por la patóloga, Dra. Nancy Elena Guzmán Delgado, para la interpretación de los hallazgos.

4.2.10. Análisis estadístico de los resultados.

Los resultados de los experimentos realizados se analizaron empleando las pruebas estadísticas de ANCOVA y Kaplan-Meier.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1. GENERACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL Ad5RSV-HPV16 E7.

5.1.1. Subclonación del DNAc que codifica para la proteína E7 del HPV 16 en el vector acarreador pAd1.1RSV-bpA.

El primer paso para generar el vector adenoviral de interés fue subclonar el DNA complementario que codifica para la proteína E7 en el vector acarreador. Se confirmó mediante la digestión con la enzima *Hind* III que efectivamente el fragmento correspondiente a E7 se había incorporado en el vector de expresión (figura 4) y de acuerdo al resultado de la secuenciación, que éste se había insertado en la orientación adecuada para expresión. De esta forma se obtuvo el vector pAd1.1RSV-bpA-E7 que se utilizó en el siguiente paso.

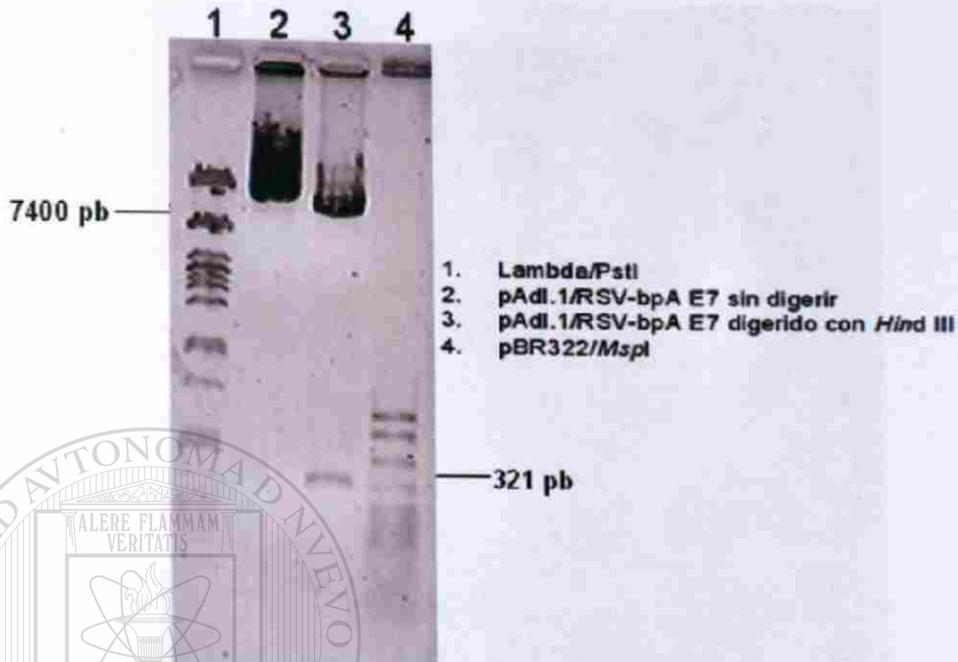


Figura 4. Caracterización del vector pAdl.1/RSV-bpA E7 . Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión del vector acarreador que porta la secuencia de E7 con la enzima *Hind* III; la digestión con esta enzima libera el inserto de 321 pb correspondientes a E7.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

5.1.2. Cotransfección en células HEK 293 y ensayo en placa.

Se realizó la cotransfección de pAdl.1RSV-bpA-E7 y pJM17 y después de 14 días de incubación identificamos halos de lisis que ponían de manifiesto la presencia de partículas virales activas (Figura 5). Posteriormente procedimos a identificar el vector adenoviral de interés.

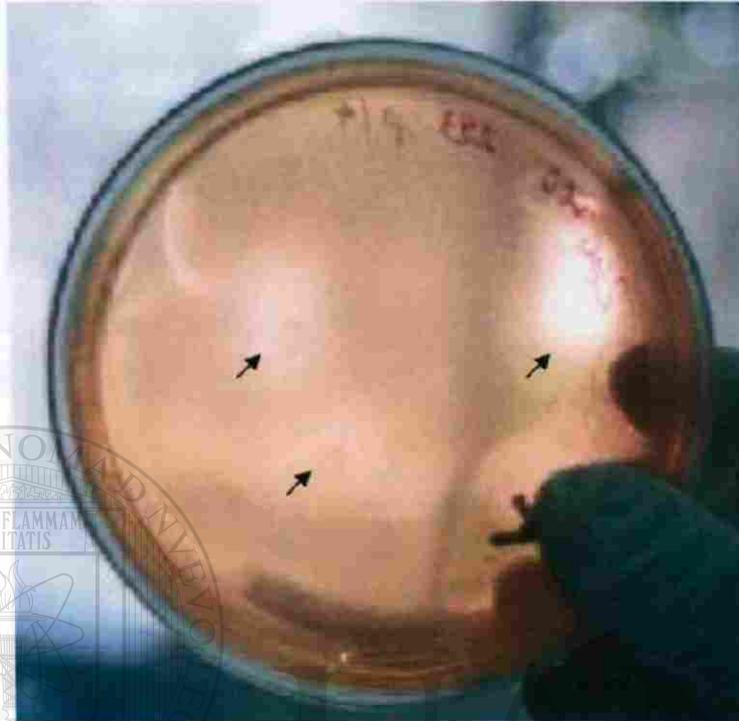


Figura 5. Halos de lisis en células cotransfectadas. Se muestra la cotransfección de pAd1./RSV-bpA-E7 y pJM17. Con las flechas se señala las áreas de lisis que ponen de manifiesto la presencia de partículas virales activas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.1.3. Identificación del recombinante adenoviral.

Con ayuda de los iniciadores RSV 372 S y E7, se analizó mediante PCR las placas de lisis obtenidas y se constató que correspondían al vector adenoviral recombinante pAd5RSV-HPV16E7. Como se muestra en la figura 6, se amplificó un fragmento del tamaño esperado de aproximadamente 259pb.

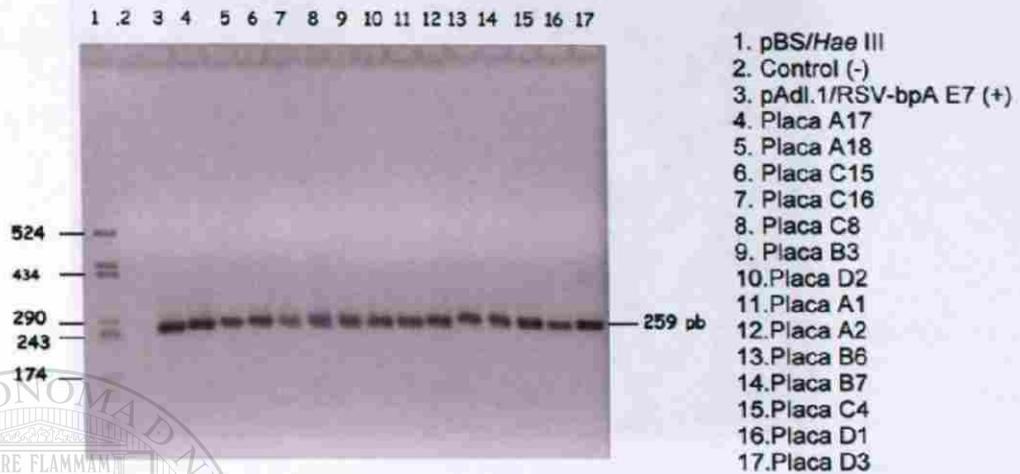


Figura 6. Identificación mediante PCR del adenovirus recombinante pAd5RSV-HPV16E7. Gel de agarosa al 1% en donde se muestra la banda correspondiente al producto amplificado de 259 que confirma la identidad del vector adenoviral recombinante que porta la secuencia que codifica para la proteína E7.

5.2. PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA Y PURIFICACIÓN DE LOS VECTORES DE TERAPIA GÉNICA.

Se transdujeron 100 placas de células HEK 293 con cada uno de los vectores adenovirales empleados para los ensayos de terapia génica; después de dos días se observó un efecto citopático del 100% (Figura 7), entonces las células se lisaron y los virus se purificaron por centrifugación en un doble gradiente de CsCl.

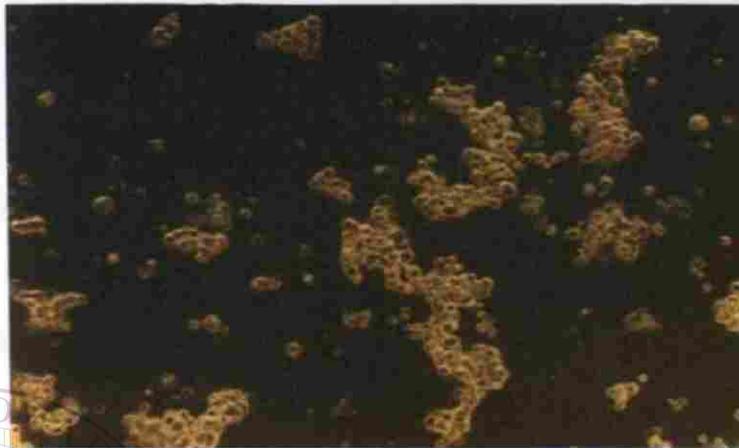


Figura 7. Efecto citopático en células HEK 293. Se observa que la morfología de las células aparece redondeada, después de dos días de haber realizado transducción con adenovirus, lo cual es un rasgo característico del efecto citopático.

En la tabla II se muestran los resultados de la cuantificación de partículas

virales a partir de los adenovirus purificados. A éstas preparaciones se les realizaron pruebas de esterilidad, las cuales resultaron negativas en todos los casos.

Tabla II. Cuantificación de partículas virales. Se muestran los resultados de la cuantificación de cada una de las preparaciones adenovirales purificadas en gradiente de CsCl.

Vector adenoviral	pv/ml	TCID ₅₀ /ml
Ad5RSV-HPV16E7	1.0×10^{13}	6.3×10^{10}
Ad5RSV-IL2m	9.0×10^{12}	6.3×10^{10}
Ad5RSV-GMCSFm	4.8×10^{12}	6.3×10^{10}

5.3 GENERACIÓN DEL MODELO ANIMAL.

5.3.1. Generación de tumores en ratones C57BL/6.

Después del implante de 5×10^5 células tumorales y de un período de aproximadamente 13 días, observamos la aparición de tumores con un diámetro mayor promedio de 5 mm.

5.4. ESCALAMIENTO DE DOSIS DE VECTORES DE TERAPIA GÉNICA.

Los experimentos de escalamiento de dosis mostraron que la dosis máxima de 1×10^{11} p.v. fue tolerada por los ratones y no presentó efectos tóxicos en el caso de Ad5RSV-GMCSFm y Ad5RSV-HPV16 E7, mientras que en el caso de Ad5RSV-IL2m fue de 1×10^{10} p.v. Con base en este estudio, se seleccionó la dosis 5×10^{10} p.v. para llevar a cabo los experimentos comparativos de los efectos de la terapia génica en los diferentes grupos de tratamiento.

5.5. EFICACIA DE LA TERAPIA GÉNICA EN EL MODELO ANIMAL DE CÁNCER CERVICOUTERINO.

5.5.1. Curva de crecimiento tumoral.

La curva de crecimiento tumoral mostró que en ningún grupo de tratamiento hubo regresión tumoral; sin embargo se observó una ligera reducción del volumen del tumor en los grupos tratados con los adenovirus Ad5 RSV-IL2m, Ad5RSV-HPV16E7 y con la combinación de ambos vectores en el día 18. La inhibición del crecimiento tumoral que mostró una mayor diferencia fue la del

grupo tratado con IL-2 con respecto al control, después del día 18, se perdió la diferencia significativa entre ambos grupos, como lo muestra el análisis de covarianza (Figura 8). Sorprendentemente, el grupo tratado con el Ad5RSV-GMCSF muestra un crecimiento tumoral más acelerado que el resto de los grupos, incluyendo al control.

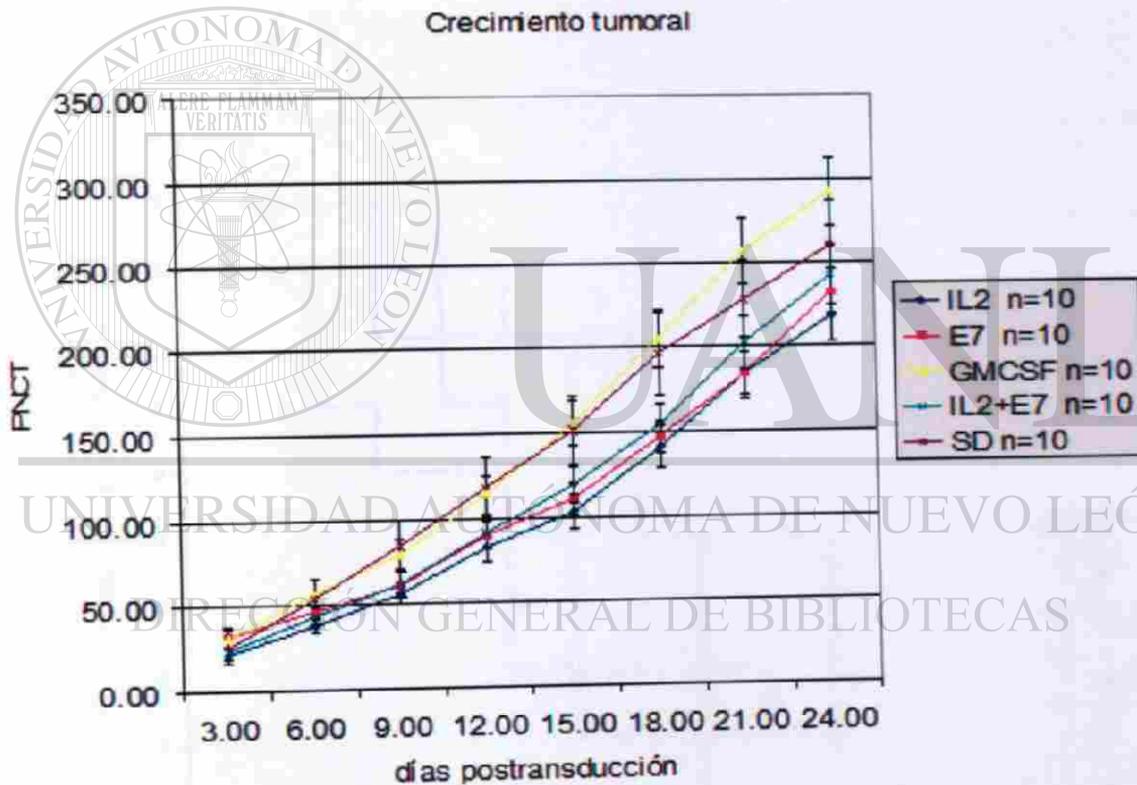


Figura 8. Efecto de los vectores de terapia génica en el modelo animal. El retraso en el crecimiento tumoral fue evidente y significativamente diferente ($p=0.000003$) en el grupo tratado con el vector Ad5RSV-IL2 (rombos) durante los 18 días posteriores a la inyección del vector terapéutico, con respecto al grupo control.

5.5.2. Análisis de supervivencia.

Este estudio no mostró ventajas de supervivencia para los grupos que recibieron los vectores terapéuticos; sin embargo el grupo tratado con Ad5RSV-IL-2m mostró una supervivencia hasta el día 51, superior a la observada en el resto de los grupos, pero que no resultó significativamente diferente de la supervivencia observada en el grupo control (Figura 9).

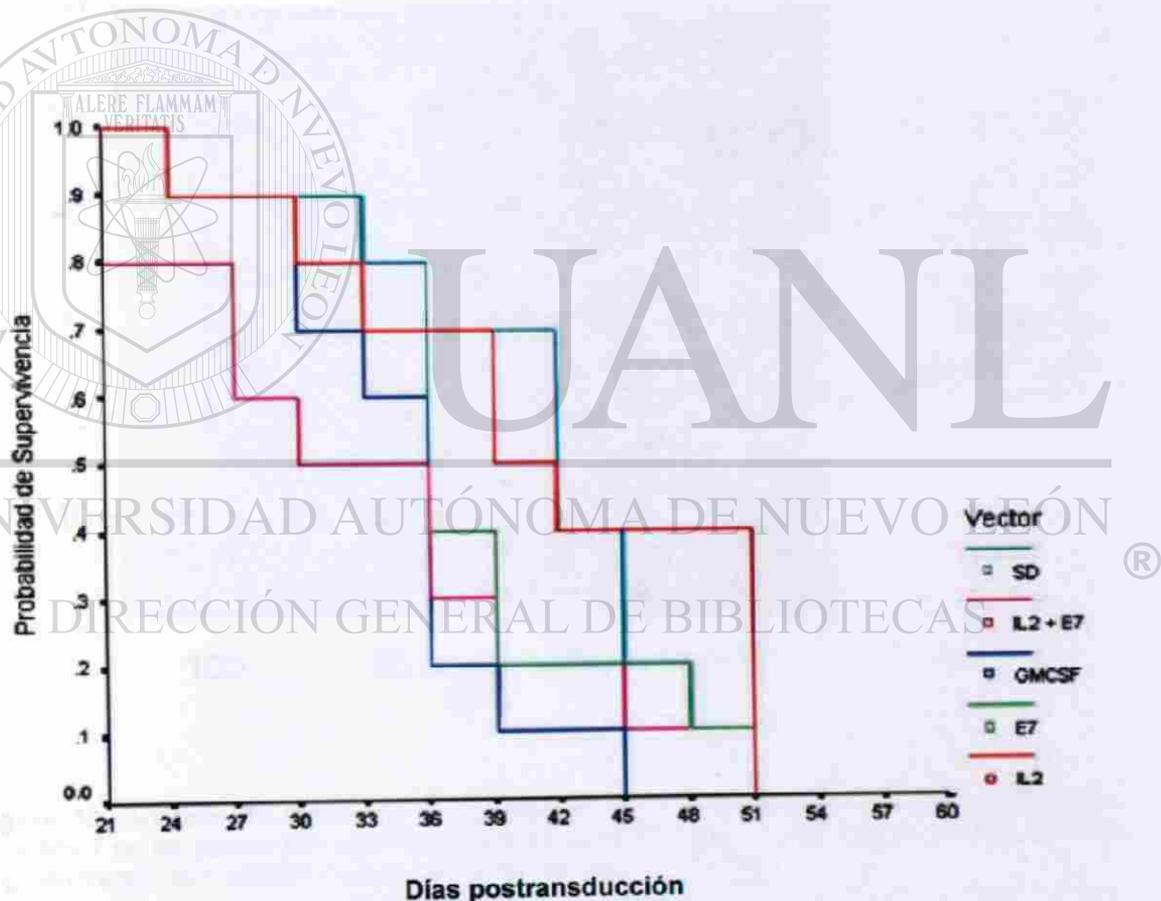


Figura 9. Análisis de supervivencia. Gráfica de Kaplan-Meier, que muestra que no hay ningún efecto de incremento de la supervivencia en los grupos terapéuticos con respecto al control. Sin embargo en el grupo tratado con Ad5RSV-IL2 se aprecia una diferencia significativa ($p=0.02$) comparado con el resto de grupos terapéuticos.

5.5.3. Ensayo de linfocitos T citotóxicos anti-TC-1.

Este análisis demostró la activación de la respuesta inmune celular en contra de la línea tumoral TC-1 en todos los grupos, pero el grupo tratado con Ad5RSV-IL2 muestra una diferencia notoriamente significativa ($p=0.004$) con respecto a el grupo control (Figura 10).

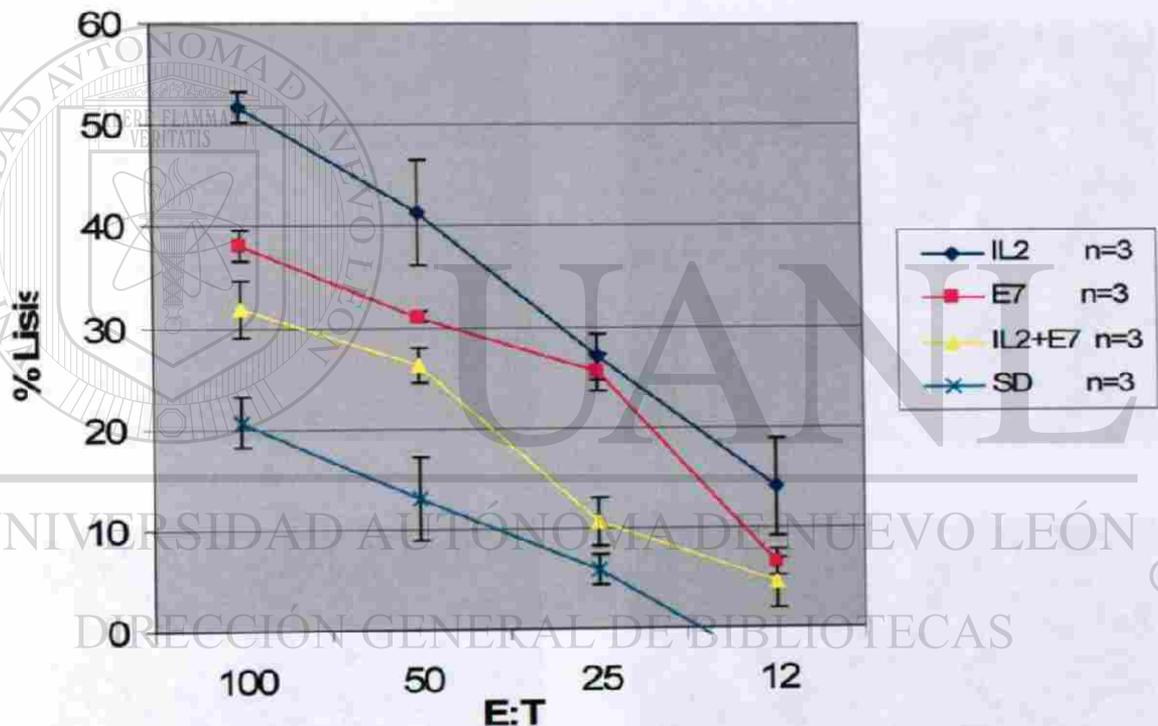


Figura 10. Análisis de linfocitos T citotóxicos. Se muestra la actividad citotóxica de los linfocitos T en los grupos de tratamiento respecto al control pero la más relevante se observa en el grupo tratado con Ad5RSV-IL2 en los pozos de relación E:T 100:1. E corresponde a las células efectoras (linfocitos T) y T corresponde a las células blanco (del inglés, target), es decir, las células TC-1.

5.5.4. Análisis histopatológico de los tumores.

En los tumores implantados se observó necrosis focal acompañada de hemorragia, lesiones de isquemia focal y numerosos capilares infiltrando la neoplasia. Sin embargo se observó solo en algunos casos infiltrado linfocitario importante (Figura 11).

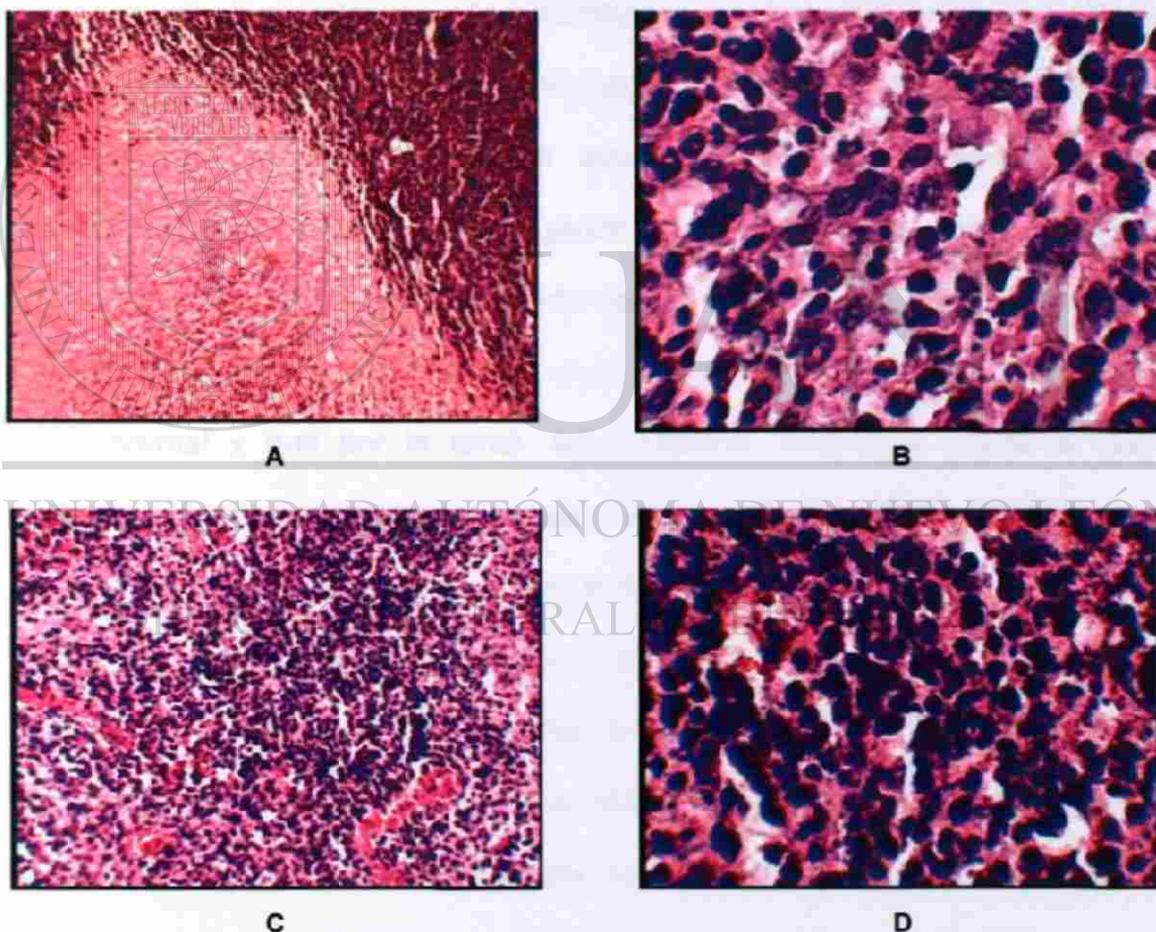


Figura 11. Análisis histológico de tumores. Cortes tumorales teñidos con H y E. Se observa un tumor tratado con SD (A y B) y un tumor tratado con Ad5RSV-IL2m (C y D). A pesar de que se observaron áreas de infiltración linfocitaria en los tumores tratados con Ad5RSV-HPV16E7, Ad5RSV-IL2m y Ad5RSV-GMCSFm los resultados intragrupo no fueron consistentes. A y C: Magnificación 50x. B y D: Magnificación 400x.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

La cirugía, la radioterapia y la quimioterapia son tratamientos estándares en oncología (44,45) pero en varias ocasiones no son muy eficaces y además, su utilización se asocia con efectos adversos indeseables, principalmente secundarios a sus efectos sobre órganos y tejidos extratumorales. La terapia génica del cáncer es una herramienta relativamente nueva, con el potencial para erradicar células tumorales con un buen grado de selectividad sin dañar el tejido normal y que por lo tanto, tenga efectos sistémicos adversos más limitados (46). Este tratamiento involucra la utilización de métodos moleculares para reemplazar genes defectuosos o ausentes implicados en el proceso neoplásico, para contrarrestar genes sobreexpresados, o para introducir modificaciones genéticas que cambien el metabolismo celular y puedan ser benéficas en el tratamiento del cáncer (47-50). Una de las modalidades de la terapia génica es la inmunogenoterapia, cuyo objetivo, en el caso particular del cáncer, es potenciar la respuesta inmune contra las células tumorales, pero no contra las células normales (51). Como con cualquier otro medicamento, las características terapéuticas de los genes de terapia génica deben probarse y el

uso de modelos animales permite evaluar el potencial de aplicación de este tipo de tratamientos nuevos.

Se han realizado varios trabajos en los cuales se han empleado vectores virales que portan las secuencias génicas aquí empleadas y en los que se ha encontrado cierta eficacia terapéutica en neoplasias, incluidos algunos estudios sobre CaCU (40,52-56), pero se han realizado pocos estudios que combinen el tratamiento de proteínas antigénicas e interleucinas. Debido a que en este tipo de tumor se reconoce la participación de un antígeno asociado a tumor, como la proteína viral E7, y la participación del sistema celular inmune para controlar esta neoplasia, entre las cuales se han reportado las interleucinas del tipo Th1, se planteó como objetivo de este trabajo el investigar la eficacia antitumoral de vectores adenovirales portando los genes de la IL-2m, y del GM-CSFm, así como el antígeno asociado a tumor E7 del HPV 16, en un modelo murino de CaCU (implantación subcutánea de células TC-1), en el cual los vectores se inyectaron directamente en el tumor.

Como en los ensayos de terapia génica es importante determinar la dosis de vector que debe administrarse para observar un efecto terapéutico de forma segura para que no resulten tóxicos al ser aplicados, hicimos lo propio en este estudio. Con el vector Ad5RSV-IL2m se observó un efecto antitumoral a la dosis de 5×10^{10} p.v. similar a la reportada por otros autores (40), mientras que la dosis de 1×10^{11} p.v. resultó tóxica. Aunque en el presente trabajo no se observó toxicidad con los vectores Ad5RSV-GMCSFm y Ad5RSV-E7 a una dosis de 1×10^{11} p.v., se utilizó una dosis similar a la empleada con el Ad5RSV-

IL2m. Es importante mencionar que en otros tumores se ha reportado que la administración de vectores adenovirales que portan la secuencia codificante de IL-2 tienen un efecto antitumoral importante, solo o en combinación con otras interleucinas o con antígenos asociados a tumor (40,52,57,58) y que por lo tanto, se decidió explorar el efecto de combinaciones con IL-2 en nuestro modelo a dosis semejantes a las establecidas en los estudios de escalamiento de dosis.

Como se hizo notar en el capítulo de resultados, las curvas de crecimiento tumoral muestran que los tratamientos con Ad5RSV-IL2m, Ad5RSV-E7 y Ad5RSV-IL2m+Ad5RSV-E7 tuvieron una respuesta antitumoral, en comparación con los tratamientos con Ad5RSV-GMCSFm y SD, pero cuando se observan los resultados globales de los experimentos realizados, la respuesta terapéutica más interesante fue la observada con el vector Ad5RSV-IL2m administrado de manera aislada. Para este grupo experimental se determinó un retraso en el crecimiento tumoral hasta el día 18 postransducción en los tumores tratados, la cual resultó estadísticamente significativa. También se registró una importante respuesta en el grupo tratado con este vector en el ensayo de CTLs que no se observó en los otros grupos experimentales. Sin embargo, el análisis de las curvas de Kaplan-Meier muestra que la terapia con Ad5RSV-IL2m no ofreció una ventaja significativa para la supervivencia de este grupo de tratamiento, indicando que la respuesta citotóxica observada no fue suficiente para generar una actividad antitumoral eficaz.

De manera general, los hallazgos histopatológicos para el grupo tratado con Ad5RSV-IL2m y para el resto de los grupos experimentales reflejaron áreas de crecimiento expansivo con rica vascularización y áreas de necrosis focal acompañadas de hemorragia; lesiones de isquemia focal y numerosos capilares infiltrando la neoplasia, acordes con la observación del crecimiento neoplásico. Solo en algunos casos se observó un infiltrado linfocitario importante, pero este no se limitó a un grupo experimental particular, observándose en algunos ratones de cada grupo, por lo que no se pueden generar conclusiones acerca de respuesta inmune importante mediada por linfocitos *in-vivo* en estos estudios anatomopatológicos, lo que contrasta con los hallazgos del ensayo de linfocitos T citotóxicos, en donde se encontró una buena respuesta en el grupo tratado con el Ad5RSV-IL2m. Lo anterior probablemente se deba entre otras cosas a que la respuesta *in vivo* está influida por el microambiente tumoral y al rápido crecimiento tumoral en este modelo de estudio del cáncer.

Los resultados de este estudio corroboran los de otros ensayos preclínicos en donde los vectores adenovirales que portan el gen de IL-2 tienen actividad antitumoral (un ejemplo es el cáncer mamario), debido a la capacidad de esta citocina de estimular la actividad de los linfocitos T (40,41,59-61). Sin embargo, en el caso particular de este modelo de CaCU, la administración de Ad5RSV-IL-2m no es suficiente, aunque es posible que la combinación de esta citocina con otros inmunostimuladores pudiera mejorar la respuesta terapéutica.

En la inmunoterapia, los antígenos específicos de tumor son capaces de inducir una fuerte inmunidad protectora mediada por células T contra tumores. En la infección con HPV y cáncer cervical, E7 ha sido un blanco principal de vacunación terapéutica y profiláctica debido a que puede ser altamente inmunogénica y ser expresada en células de cáncer cervical (34,51,62,63). Shick y cols. encontraron que la administración intratumoral de Ad5-IL12 en combinación con la proteína E7 tuvo efecto en un modelo murino de CaCU observándose un 40% de regresión tumoral (63).

En lo que corresponde a la administración del Ad5RSV-E7 en este estudio, no se observó una respuesta terapéutica al compararse con el grupo control. Además, la combinación de este vector con Ad5RSV-IL2m no mostró sinergia, lo que contrasta con el trabajo de Shick y cols. donde se observa regresión tumoral al administrar simultáneamente Ad-IL12 y E7. Esto se podría atribuir a que en este último trabajo se administró la proteína E7 en dos ocasiones, lo cual pudo favorecer una respuesta inmune más prolongada, o también a una mayor potencia de la interleucina IL-12 (63).

Con respecto al vector Ad5RSV-GMCSFm, se han realizado trabajos en los que se ha empleado un adenovirus que codifica esta interleucina para transducir células tumorales de pulmón en un modelo murino. La terapia génica utilizando exclusivamente esta citocina o en combinación con una proteína de choque térmico demostraron regresión tumoral (54, 64).

En el presente trabajo, se observó en la curva de crecimiento tumoral que Ad5RSV-GMCSFm no mostró respuesta antitumoral.

La interleucina GM-CSF regula el crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas y está involucrada en la angiogénesis (65-72). Esta citocina se ha empleado ampliamente para potenciar el número y la actividad de granulocitos y monocitos aumentando por consiguiente la defensa del huésped (73). Aparte de su actividad inmunológica, GM-CSF también estimula la migración de células endoteliales y la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes (angiogénesis) (67,74-76). Este proceso está regulado estrechamente por factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Teóricamente, GM-CSF también puede inhibir la angiogénesis (67,77,78).

Como es sabido el crecimiento continuo de las neoplasias y la producción de metástasis depende de un suministro adecuado de sangre. La extensión de la angiogénesis está determinada por el balance entre moléculas reguladoras positivas y negativas. Los mecanismos que regulan la angiogénesis en tumores de diferentes orígenes histológicos, son diversos (79). En pacientes con cáncer de cabeza y cuello se ha asociado la expresión de citocinas proinflamatorias y proangiogénicas con un incremento en el crecimiento tumoral y metástasis y una disminución en la supervivencia (80,81), de manera que se postula que esas citocinas pueden jugar un papel importante en promover la tumorigénesis *in vivo* (80,82). En un estudio de carcinogénesis cutánea se observó que factores de crecimiento hematopoyético como GMCSF pueden funcionar como mediadores de progresión tumoral *in vivo* (83,84).

En este trabajo se anticipaba un efecto antitumoral con la administración del Ad5RSV-GMCSFm. Sin embargo, con los antecedentes mencionados,

puede suponerse que los hallazgos obtenidos con este vector se hayan debido a la actividad angiogénica de la citocina, lo cual pudo haber favorecido la progresión del tumor.

De acuerdo a los resultados de este trabajo, en un estudio futuro valdría la pena explorar la eficacia preclínica de la combinación de un tratamiento de terapia génica con Ad5RSV-IL2 con otros inmunoestimuladores. También sería interesante ensayar la administración de éste adenovirus con tratamientos antineoplásicos convencionales como la radioterapia o la quimioterapia, como se ha reportado en otros estudios en los que hacen combinaciones similares entre inmunogenoterapia y otros agentes antitumorales (44,85).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

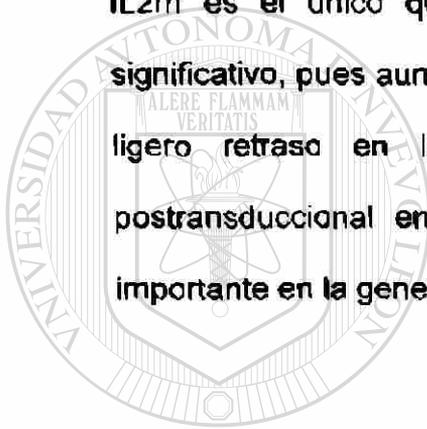
Los estudios de supresión de crecimiento tumoral, de supervivencia y de linfocitos T citotóxicos muestran en general que:

- Ad5RSV-IL2m generó una respuesta terapéutica al día 18 de tratamiento.
- Ad5RSV-E7 tuvo un efecto terapéutico, pero menor que el de Ad5RSV-IL2m.
- La combinación de Ad5RSV-IL2m+ Ad5RSV-E7 no mostró sinergia o efecto aditivo. Por el contrario, mostró menor efecto que Ad5RSV-IL2m solo.
- La inyección intratumoral de Ad5RSV-GMCSF no resulta en una supresión del crecimiento tumoral.
- En el estudio de supervivencia no hubo diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento.
- El ensayo de linfocitos citotóxicos para analizar el efecto inmunológico, revela diferencias entre los grupos de tratamiento; se observa una respuesta citotóxica incrementada en el grupo tratado con Ad5RSV-IL2m

que fue incluso superior que en el grupo combinado Ad5RSV-IL2m+Ad5RSV-E7.

- Los estudios histopatológicos no sugieren un efecto citolítico e inflamatorio antitumoral en los tratamientos realizados.

Los resultados de este trabajo, con este modelo animal en particular, sugieren que de todos los vectores probados en este estudio el Ad5RSV-IL2m es el único que tuvo un efecto antineoplásico estadísticamente significativo, pues aunque no fue capaz de eliminar el tumor, sí demostró un ligero retraso en la evolución de la neoplasia hasta el día 18 postransduccional en los ratones tratados y demostró tener un efecto importante en la generación de linfocitos citotóxicos en los ensayos *in-vitro*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Annex Table 3 Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions. Estimates for 1999. En: World Health Report 2000. <http://www.who.int/whr/2000/en/report.htm>
2. Landis SH, Murray T., Bolden S *et al.* 1998. Cancer Statistics, 1998. CA Cancer J Clin 48:6-29.
3. Muñoz N and Bosch X. 1996. The Causal Link between HPV and Cervical Cancer and Its Implications for Prevention of Cervical Cancer. Bulletin of PAHO 30:362-377.
4. Restrepo H, González J, Roberts E, y Litvak J. 1987. Epidemiology and control of cancer of the cervix uteri in Latin America and the Caribbean. Bol Oficina Sanit Panam 102:578-592.
5. Ruiz-Velasco V. Cáncer Cervico-Uterino. 1995. Ginecología y Obstetricia. Tercera Edición. Mendez Editores. México, D.F., México. 889-902.
6. Crystal RG. 1995. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. Science 270: 404-410.
7. Miller AD. 1992a. Human gene therapy comes of age. Nature 357: 455-460.
8. Mulligan, RC. 1993. The basic of gene therapy. Science 260:926-932.

9. Robbins PD y Ghivizzani SC. 1998. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol. Ther.* 80: 35-47.
10. Rensing ME, Sette A, Brandt RMP, Rupert J, Wentworth Pa, Hartman M, Oseroff C, Grey Hm, Melief CJ y Kast WM. 1995. Human CTL Epitopes Encoded by Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Identified Through *In-vivo* and *In-vitro* Immunogenicity Studies of HLA-A*0201-Binding Peptides. *J Immunol* 154:5934-5943.
11. Vogelstein B y Kinzler K.W. 1998. The Genetic Basis of Human Cancer. Chapter 36. McGraw Hill. Baltimore, MD. pag:631-637.
12. Sample, C. y Kieff, E. 1991. Molecular basis for Epstein-Barr virus induced pathogenesis and disease. *Springer Semin Immunopathol* 13:133-146.
13. Tartour E, Mathlot C y Fridman WH. 1992. Current status of interleukin-2 therapy in cancer. *Biomed and Pharmacother* . 46: 473-484.
14. Fraker DL, Langstein HN y Norton JA. 1989. Passive immunization against tumor necrosis factor partially abrogates interleukin 2 toxicity. *J Exp Med.* 170: 1015-20
15. Kolitz JE y Merstelsmann M. 1991. The immunotherapy of human cancer with interleukin-2: Present status and future directions. *Cancer Invest.* 9: 529-42
16. Lotze MT. 1992. T-cell growth factors and the treatment of patients with cancer. *Clin Immunol Immunopathol.* 62: S47-54

17. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Aebersold PM, Linehan M, Seipp CA y White DE. 1989. Experience with the use of high dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann Surg.* 210:474-84
18. Thompson JA, Lee DJ, Cox WW, Lindgren CG, Collins C, Neraas KA, Dennin RA y Fefer A. 1987. Recombinant interleukin-2 toxicity, pharmacokinetics and immunomodulatory effects in a phase I trial. *Cancer Res.* 47: 4202-7
19. West WH, Tauer KW, Yannelli JR, Aeshall GD, Osr DW, Thurman GB y Oldham RK. 1987. Constant infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *N Engl J Med.* 316: 898-905
20. Chen LP, Thomas EK, Hu SL, Hellstrom I. y Hellstrom KE. 1991. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 110-114.
21. Feltkamp MC, Smits HL y Vierboom MP. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol.* 23:2242-9.
22. Gariglio P, Benitez-Bribiesca L, Berumen J, Alcocer JM, Tamez R. y Madrid V. 1998. Therapeutic uterine-cervix cancer vaccines in humans. *Archives of Medical Research* 29(4):279-284.
23. Luxton JC. 1996. Proliferative T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and

- cervical carcinoma and in healthy individuals. *J. General Virology* 77:1585-1593.
24. Chang EY, Chen CH, Ji H, Wang TL, Hung K, Lee BP, Huang AY, Kurman RJ, Pardoll DM y Wu TC. 2000. Antigen-specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogeneic tumor cell-based vaccine. *Int. J. Cancer* 86: 725-730.
25. Cesano A, Visonneau S, Clark SC. y Santolini D. 1993. Cellular and molecular mechanisms of activation of MHC nonrestricted cytotoxic cell by IL-12. *J. Immunol* 151:2943-2957.
26. Vile R, Russell SJ. 1994. Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer. *Gene Therapy*. 1:88-98.
27. Mountain A. 2000. Gene therapy: the first decade. *TIBTECH* 18: 119-128.
28. Romano G, Micheli P., Pacilio C y Giordano A. 2000. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells*. 18:19-39.
29. Gómez-Navarro J, Curiel DT y Douglas JT. 1999. Gene therapy for cancer . *Eur J Cancer* 35: 867-885.
30. Douglas JT. y Curiel DT. 1997. Adenoviruses as vectors for gene therapy. *Science and Medicine*, marzo-abril. 44-53.
31. Thyagarajan B., Phillips JE y Calos MP. 2001. Gene delivery by viruses. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group/www.els.net. 1-5.

32. Havenga MJ, Lemckert AA, Opshorst OJ, Van-Meijer M, Germeraad WT, Grimbergen J, van Doel MA, Vogels AA, de Bruijn JD, Uytdehaag F, Quax PH, Logtenberg T, Mehtali M. y Bout A. . 2002. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *Journal of Virology*. 76(9): 4612-4620.
33. Vasquez EC., Beltz TG. Meyrelles SS. y Johnson AK. 1999. Adenovirus-mediated gene delivery to hypothalamic magnocellular neurons in mice. *Hypertension*. 34(2):756-761.
34. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM. y Wu TC.1996. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Research*. 56:21-26.
35. Mittereder N., March KL. y Trapnell BC. 1996. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med. J of Virol*. 70:7498-7509.
36. Nyberg-Hoffman C. y Aguilar-Cordova E. 1999. Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat Med* 5(8): 955-7.
37. Mittereder N, March KL y Trapnell BC. 1996. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. of Virology* 70:7498-7509.

38. Janik P., Briand P. y Hartmann NR. 1975. The effect of estrone-progesterone treatment on cell proliferation kinetics of hormone-dependent GR mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 35:3698-3704.
39. Eastham J. A., Chen S. H., Sehgal I., Yang G., Timme T. L., Hall S. J., Woo SL. y Thompson T. C. 1996. Prostate cancer gene therapy: herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction followed by ganciclovir in mouse and human prostate cancer models. *Human Gene Therapy* 7:515-523.
40. Addison CL, Braciak T, Ralston R, Muller WJ, Gaudie J y Graham FL. 1995. Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:8522-8526.
41. Saffran DC, Horton HM, Yankauckas MA, Anderson D, Bamhart KM, Abai AM, Hobart P, Manthorpe M, Norman JA y Parker SE. 1998. Immunotherapy of established tumors in mice by intratumoral injection of interleukin-2 plasmid DNA: induction of CD8+ T-cell immunity. *Cancer Gene Therapy* 5(5): 321-330.
42. Nociari MM, Shalev A., Benias P. y Russo C. 1998. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 213: 157-167.
43. Kruisbeek AM. 2000. In vitro assays for mouse lymphocyte function. *Current Protocols in Immunology.* John Wiley and sons. 3.1.1-3.5.15.
44. Tech BS, Aguilar-Cordova E, Vlachaki MT, Aguilar L, Mai WY, Caillouet J, Davis M, Miles B, Kadmon D, Ayala G, Lu HH, Chiu JK, Carpenter

- LS, Woo SY, Grant WH 3erd, Wheeler T, Thompson TC. Y Butler EB. 2002. Combining radiotherapy with gene therapy (from the bench to the bedside): a novel treatment strategy for prostate cancer. *The Oncologist*. 7:458-466.
45. Hellman S, y Weichselbaum RR. 1996. Radiation Oncology. *JAMA*. 275:1852-1853.
46. Greco O, y Dachs GU. 2001. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *Journal of Cellular Physiology*. 187: 22-36.
47. Frisch SM. 1994. E1 A induces the expression of epithelial characteristics. *J. Cell Biol*. 127:1085-1096.
48. Frisch SM., Reich R, Collier IE, Genrich T, Martin G y Goldberg GI. 1997. Adenovirus E1A represses protease gene expression and inhibits metastasis of human cells. *Oncogene*. 5:75-83.
49. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonell TJ, Milliangi P, Shi YX, Levin VA, Yung WK, y Kyritsis AP. 2000. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogen*. 19:2-12.
50. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, y Barenholz Y. 1994. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res*. 54:987-92.

51. Ji Y., Chang y Kurgan. 1998. Antigen-specific immunotherapy for murine lung metastatic tumors expressing human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Int. J. Cancer*. 78:41-45.
52. Stewart AK, Lassam NJ, Quirt IC, Bailey DJ, Rotstein LE, Krajden M, Dessureault S, Gallinger S, Cappe D, Wan Y, Addison CL, Moen RC, Gaudie J. y Graham FL. 1999. Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase 1 clinical trial. *Gene Ther*. 6: 350-363.
53. Felzmann T, Ramsey WJ y Blaese RM. 1997. Characterization of the antitumor immune response generated by treatment of murine tumors with recombinant adenoviruses expressing HSVtk, IL-2, IL-6 or B7-1. *Gene Ther*. 4:1322-1329.
54. Lee CT, Wu S, Ciemik F, Chen H, Nadaf-Rahrov S, Gabrilovich D. y Carbone DP. 1997. Genetic immunotherapy of established tumors with adenovirus-murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Human Gene Therapy* 8:187-193.
55. Lamikanra A., Pan ZK., Isaacs SN, Wu TC y Paterson Y. 2001. Regression of established human papillomavirus type 16 (HPV-16) immortalized tumors in vivo by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8⁺ T-cell responses that home to the tumor site. *Journal of Virology*. 75: 9654-9664.
56. Daemen T., Pries F., Bungener L., Kraak M., Regts J. y Wilschut J. 2000. Genetic immunization against cervical carcinoma: induction of

- cytotoxic T lymphocyte activity with a recombinant alphavirus vector expressing human papillomavirus type 16 E6 and E7. *Gene Ther.* 7:1859-1866.
57. Haddada H., Ragot T., Cordier L., Duffour MT. y Perricaudet M. 1993. Adenoviral interleukin-2 gene transfer into p815 tumor cells abrogates tumorigenicity and induces antitumoral immunity in mice. *Hum. Gene Ther.* 4: 703-711.
58. Cordier L., Duffour MT, Sabourin JC, Lee MG, Cabannes J., Ragot T., Perricaudet M y Haddada H. 1995. Complete recovery of mice from a pre-established tumor by direct intratumoral delivery of an adenovirus vector harboring the murine IL-2 gene. *Gene Ther.* 2:16-21.
59. Schmidt W, Schweighoffer T, Herbst E, Maass G, Berger M, Schilcher F, Schaffner G. y Birnstiel ML. 1995. Cancer vaccines: the interleukin 2 dosage effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 4711-4714.
60. Indrová M, Bubeník J, Šimová J, Bieblová J, Jandlová T, Smahel M, Vonka V, Glazman-Kusnierczyk H, Patjtasz-Piasecka E, Radzikowski C. y Mikysková R. 2002. Tumour-inhibitory and antimetastatic effects of IL-2 in mice carrying MHC class I-tumours of HPV16 origin. *International Journal of Oncology.* 20: 643-646.
61. Mikysková R., Bubeník J., Mendoza L., Vodka V., Smahel M., Šimová J. y Jandlová T. 2001. Local cytokine treatment of HPV 16-associated tumours results in inhibition of their lung metastases. *Clinical and Experimental Metastasis.* 18: 581-587.

62. Shick W., Bae SM, Kim TY., Kim TG, Lee JM., Namkoong SE, Kim CK y Sin JI. 2003. A therapy modality using recombinant IL-12 adenovirus plus E7 protein in a human papillomavirus 16 E6/E7-associated cervical cancer animal model. *Hum. Gene Ther.* **14**:1389-1399.
63. Wang TL, Ling M, Shih IM, Pham T, Pai SI, Lu Z, Kurman RJ y Pardoll DM. 2000. Intramuscular administration of E7-transfected dendritic cells generates the most potent E7-specific anti-tumor immunity. *Gene Ther.* **7**:726-733.
64. Kojima T, Yamazaki K, Tamura Y, Ogura S, Tani K, Konishi J, Shinagawa N, Kinoshita I, Hizawa N, Yamaguchi E, Dosaka-Akita H. y Nishimura M. 2003. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transduced tumor cells combined with tumor-derived gp96 inhibit tumor growth in mice. *Hum. Gene Ther.* **14**: 715-728.
65. Tsukada T, Eguchi K, Migita K, Kawabe Y. y Nagataki S. 1997. Signal Transduction of Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor in a Human Endothelium Derived Cell Line. *Tohoku J. Exp. Med.* **183**, 185-195.
66. Pinedo HM, De Grujil TD, Van der Wall E, Buter J. 2000. Biological concepts of prolonged neoadjuvant treatment plus GM-CSF in locally advanced tumors. *The Oncologist.* **5**:497-500.
67. Wu F, Westphal JR, Hoekman K., Mel AK, Stadius Muller MG, de Waal RW, Beelen RH, van Leeuwen PA, Meijer S y Cuesta MA. 2004. The

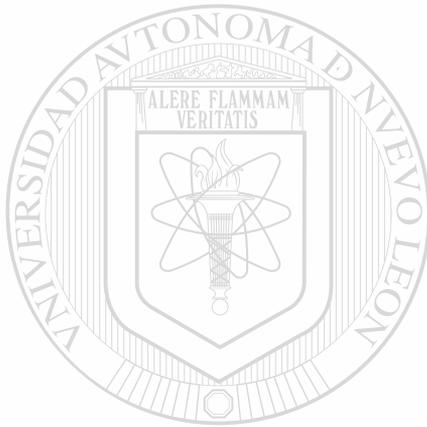
- effects of surgery , with or without rhGM-CSF, on the angiogenic profile of patients treated for colorectal carcinoma. *Cytokine*. 25:68-72.
68. Bussolino F, Ziche M Wang JM, Alessi D, Morbidellini L, Cremona O, et al. 1991. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J. Clin Invest*. 87:986-95.
69. Soldi R, Primo L, Brizzi MF, Sanavio F, Aglietta M, Polentarutti N, Pegoraro L, Mantovani A, y Bussolino F. 1997. Activation of JAK2 in human vascular endothelial cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 89: 863-872.
70. Phillips GD, Stone AM, y Schultz JC. 1997. Do growth factors stimulate angiogenesis?. A comparison of putative angiogenesis factors. *Wounds*. 9: 1-14.
71. Knighton DR, Phillips GD, y Fiegel VD. 1990. Wound healing angiogenesis: Indirect stimulation by basic fibroblast growth factor. *J Trauma* 30:S134-S144.
72. Kucukcelebi, A, Carp SS, Hayward PG, Hui P, Cowan WT, Ko F, Cooper DM, y Robson MC 1992. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor reverses the inhibition of wound contraction caused by bacterial contamination. *Wounds*. 4:241.
73. Mels AK, Muller MG, Van Leeuwen PA, Von Blomberg BM, Scheper RJ, Cuesta MA, Beelen MH, y Meijer S.2001. Immune-stimulating effects of low-dose perioperative recombinant granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor in patients operated on for primary colorectal carcinoma. *Br J Surg*. 88:539-44.
74. Bussolino F, Ziche M, Wang M, Alessi D, Morbidelli L, Cremona O, Bosia A, Marchisio PC, y Mantovani A. 1991. *In vitro* and *in vivo* activation of endotelial cells by colony-stimulating factors. *J. Clin. Invest.* 87: 986-995.
75. Valdembri D, Serini G, Vacca A, Ribatti D, Bussolino F. 2002. *In vivo* activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF. *FASEB J*. 16: 225-7.
76. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B. 2001. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 104: 2012-2017.
77. Joseph IB, e Isaacs JT. 1998. Macrophage role in the anti-prostate cancer response to one class of antiangiogenic agents. *J Natl Cancer Inst*. 90: 1648-53.
78. Wahl LM, Kleinman HK. 1998. Tumor-Associated Macrophages as targets for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 90: 1583-1584.
79. Wolf F, Hudson J, Peterson K, Miller H y McClatchey K. 1986. Lymphocyte subpopulations infiltrating squamous carcinomas of the head and neck: correlations with extent of tumor and prognosis. *Otolaryngol. Head Neck Surg*. 95: 142-152.

80. Chen Z, Malhotra SP, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, y Van Waes C. 1999. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* 5:1369-1379.
81. Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Collins SL, Petruzelli GJ, y Young MR. 1995. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34+ cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin. Cancer Res.* 1:95-103.
82. Ninck S, Reisser C, Dyckhoff G, Helmke B, Bauer H, Herold-Mende C. 2003. Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer.* 106: 34-44.
83. Mueller MM, Peter W, Mappes M, Huelsen A, Steinbauer H, Boukamp P, Vaccariello M, Garlick J, y Fusenig NE. 2001. Tumor progression of skin carcinoma cells *in vivo* promoted by clonal selection, mutagenesis, and autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *American Journal of Pathology.* 159: 1567-1579.
84. Wislez M, Fleury-Feith J, Rabbe N, Moreau J, Cesari D, Milleron B, Mayaud C, Antoine M, Soler P, y Cadranel J. 2001. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor prolong the survival of neutrophils infiltrating

bronchoalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma. American Journal of Pathology. 159: 1423-1433.

85. Indrová M. *et al.* 2001. Chemoimmunotherapy of cancer: potentiated effectiveness of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and ifosfamide derivative CBM-4A. Oncology Reports. 8:1371-1374.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Irma Alicia Martínez Dávila

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

Tesis: Terapia génica para el cáncer cérvicouterino en un modelo murino.

Campo de estudio: Terapia Génica.

Biografía:

Lugar de nacimiento: Monterrey, Nuevo León, México.

Fecha: julio 11 de 1971.

Padres: Profr. Salomón Martínez Constante y Profra. Rosa Elia Dávila Contreras.

Educación:

Licenciatura: Universidad Autónoma de Coahuila.

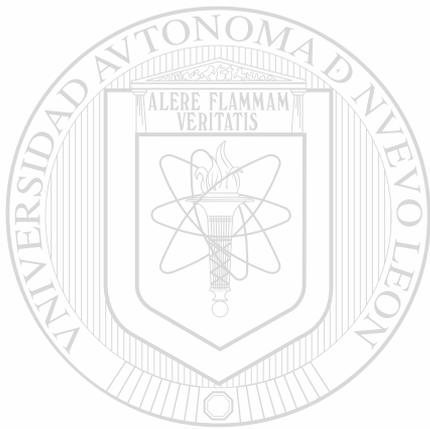
Grado obtenido: Químico Farmacobiólogo especialidad Microbiología.

Fecha: 1992.

Maestría: Universidad Autónoma de Nuevo León.

Grado obtenido: Maestro en Ciencias con especialidad en Inmunología.

Fecha: 1996.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



