

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**PRODUCCIÓN DE VECTORES PARA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
FUSOGÉNICAS APLICADAS AL ESTUDIO DE PROCESOS DE FUSIÓN
CELULAR.**

Por:

QFB. SILVIA MARÍA ALDANA SALAZAR

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada

Mayo, 2018

**PRODUCCIÓN DE VECTORES PARA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
FUSOGÉNICAS APLICADAS AL ESTUDIO DE PROCESOS DE FUSIÓN
CELULAR**

Aprobación de la tesis:

Director de la tesis: Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Co- Director de la tesis: Dr. Edgar Allan Blanco Gámez

Coordinador del posgrado en Microbiología Aplicada: Dra. María Elena Cantú
Cárdenas

Subdirector de Estudios de Posgrado: Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

RESUMEN

Silvia María Aldana Salazar **Fecha de graduación: Diciembre, 2017**

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del proyecto: Producción de vectores de expresión de proteínas fusogénicas aplicadas al estudio de procesos de fusión celular.

Número de páginas: 56

**Candidato para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con orientación
Microbiología Aplicada.**

Área de estudio: Microbiología

Propósito y método del estudio: En el presente estudio se realizó la producción de un vector plasmídico de expresión de proteínas fusogénicas en *E. coli*. Se transfectaron células BpRc1 con el plásmido pACC-F mediante lípidos catiónicos. Se cuantificó la liberación de LDH post- transfección para determinar el porcentaje de viabilidad. Además, se realizó microscopía de fluorescencia para observar la formación de poros en la membrana celular y la aparición de sincitios. El propósito del estudio es monitorear el tiempo de formación de poros en la membrana para su posible aprovechamiento estratégico en la permeabilidad celular aumentada.

Contribuciones y conclusiones: Se demostró que el plásmido pACC-F permitió seguir en tiempo real el proceso de fusión celular en la línea celular BpRc1 CRL-2217 por su capacidad de expresar la proteína fusogénica del paramyxovirus SV5, la cual desencadena la formación de poros en la membrana y la consiguiente formación de sincitios.

Firma del director de tesis: _____

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización del posgrado. Gracias por ayudar a personas que buscamos dedicarnos a la investigación científica.

Agradezco a mi familia por comprender los anhelos personales que tengo, espero en un futuro puedan ver los frutos de mi dedicación a seguir preparándome y vean que esto es parte de mi sueño que se realiza día con día.

Le doy gracias a quienes somos parte del Laboratorio de Biología Molecular: Melissa, Julio, Alberto, Ricardo y Karla, con quienes compartí buenos momentos como aprendizajes, momentos de mucho trabajo, risas, así como una buena taza de café para comenzar el día.

Estoy infinitamente agradecida con el Dr. Alberto Gómez Treviño, solo puedo decir que mejor asesor de tesis no pude tener, además aprendí de otros temas en los cuales puedo presumir que ahora soy un poco más culta.

En mi estancia de investigación en la Universidad Autónoma de Yucatán, además de aprender nuevas técnicas de laboratorio, me dio la oportunidad de conocer otras maneras de trabajar y ver otras perspectivas, agradezco a la Dra. Mónica Sánchez por recibirme en su grupo de trabajo entre ellos mis compañeritos Kin, Biali y Carlos. Le doy las gracias a la familia Cervantes Mendoza por su amistad y apoyo en recibirme por esta estancia.

Agradezco a la Universidad de Barcelona, España, por su ayuda trabajando una parte del trabajo, específicamente con la inmunodetección.

Gracias a mis amigos por estar siempre ahí en todo momento, mostrar interés y por su comprensión en este proyecto llamado “la tesis”.

A todas las personas que directa o indirectamente han aportado para la realización de este trabajo.

¡Simplemente gracias!

DEDICATORIA

A mí novio Norberto: Que esta sea la primera de otras tesis que están por venir.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	v
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xii
Capítulo I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Terapia génica.....	1
1.1.2. Virus como vectores para terapia génica.....	1
1.2 Transfección celular con lípidos catiónicos.....	3
1.3 Glicoproteínas fusogénica víricas.....	5
1.3.2 Propiedades de las glicoproteínas fusogénicas víricas.....	6
Justificación.....	8

Capítulo II	9
ANTECEDENTES	9
Aportación científica	14
Hipótesis	15
Objetivos	15
Capítulo III	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1 Propagación de vector plasmídico pACC-F en <i>E. coli</i>	16
3.1.2 Preparación de células de <i>E. coli</i> calcio competentes.....	16
3.1.3 Transformación química de <i>E. coli</i> con el vector pACC-F	17
3.2 Comprobación de F en el vector plasmídico.....	18
3.3. Aislamiento y purificación del vector pACC-F	19
3.4. Transfección celular con lípidos catiónicos.....	19
3.5 Cuantificación de LDH.....	21
3.6 Análisis de la capacidad fusogénica y formación de sincitios mediante microscopía de contraste de fases, microscopía de fluorescencia y microscopía confocal.....	23
Capítulo IV.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
4.1 Transformación del vector plasmídico en <i>E. coli</i>	27
4.2 Comprobación de F en el vector plasmídico.....	28
4.3 Aislamiento y purificación del vector plasmídico.....	29

4.4 Transfección celular	29
4.5 Cuantificación de LDH.....	30
4.7 Inmunomarcaje, microscopía de contraste de fases, microscopía de fluorescencia y microscopía confocal.....	32
Capítulo V.....	38
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1 Vectores virales más utilizados en terapia génica	3
Tabla 2 Reactivos de la PCR	18
Tabla 3 Condiciones de la PCR	18
Tabla 4 Relación de tiempo con porcentaje de citotoxicidad promedio	31

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 Paramyxovirus SV5. Se señalan las proteínas integrales de la envuelta, entre ellas la neuraminidasa (HN) y la glicoproteína de fusión (F)	5
Figura 2 Proteína F del Paramixovirus	7
Figura 3 Formación de sincitios entre células madre neurales	12
Figura 4 Plásmido pACC-F mostrando algunos de sus sitios de restricción.	17
Figura 5 Esquema de la reacción enzimática de la LDH para calcular el porcentaje de citotoxicidad	22
Figura 6 Esquema de la disposición de los ensayos en la placa de 96 pocillos	23
Figura 7 Selección de clonas transformadas. Imagen izquierda: control positivo en agar LB, imagen del centro: control negativo en agar LB/ampicilina e imagen derecha: clonas transformadas en agar LB/ampicilina	27
Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa al 1%, 75 volts, 35 minutos. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2 control negativo sin DNA, carril 3 DNA plasmídico pACC-F de aproximadamente 10.5 kb y carril 4 gen de la Glicoproteína Fusogénica de 1800 pb	28
Figura 9 Gráfico de porcentaje de citotoxicidad	31
Figura 10 Imágenes de microscopía de fluorescencia. 1) Control sin tratamiento 0 h, Células transfectadas: 2) 0 h, 3) 12 h, 4) 18 h, 5) 24 h, 6) 36 h, 7) 48 h, 8) 64 h	34

Figura 11 Efectividad fusogénica de vectores plasmídicos de expresión de
GALV.fus

36

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
bp	Par de bases
BFP	Proteína azul fluorescente
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grados celsius
cDNA	Cadena complementaria de DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	Y otros
F	Glicoproteína Fusogénica
F1	Dominio de fusión 1
F2	Dominio de fusión 2
G	Glicoproteína menor de fusión
G3A	Mutante de la proteína fusogénica
GALV	Virus de leucemia de gibones
GFP	Proteína verde fluorescente
HN	Glicoproteína de adherencia viral con actividad hemaglutinante y neuraminidasa
INT	Iodonitrotetrazolio violeta
IP	Yoduro de propidio
kp	Kilo pares de bases
LB/amp	Medio Luria Bertani/ampicilina
LDH	Lactato deshidrogenasa
Min	Minutos
N.A.	No aplica
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido

ng	Unidad de medida de masa del Sistema Internacional de Unidades, equivalente a la milmillonésima parte de un gramo
μM	Concentración molar 10 ⁻⁶ molar
PB	Buffer de fosfatos
PBS	Buffer de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PF	Péptido de fusión
pH	Potencial de hidrógeno
PLL	Polímero Poli-L-Lisina
pUC-19	Plásmido de clonación, UC abreviatura de Universidad de California
rpm	Revoluciones por minuto
RSV	Virus respiratorio sincitial
SH	Proteína de adherencia viral con un grupo tiol de sustituyente
SV5	Virus del simio 5
TAE	Solución amortiguadora de Tris acetato y EDTA
TM	Proteína transmembrana
UV	Ultravioleta
VSV-G	Virus de la estomatitis vesicular

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

1.1 Terapia génica

La terapia génica es un tratamiento alternativo a los abordajes farmacológicos, quirúrgicos y convencionales que se está desarrollando tanto a nivel experimental como clínico. Consiste en la modificación específica de un gen para prevenir o remediar trastornos hereditarios o adquiridos que deriven en una condición patológica para el organismo. Esta técnica se basa en la interferencia, corrección o sustitución del gen defectuoso dentro de las células que expresan la patología por el gen normal y su correcta proteína funcional para enlentecer, estabilizar o revertir el curso de la enfermedad. (*Santalla et al., 2013*).

1.1.2. Virus como vectores para terapia génica

En el caso de vectores de terapia génica, las partículas virales encapsulan un genoma modificado que lleva el gen terapéutico. La transducción se define como la infección abortiva (no replicativo) que introduce información genética funcional expresada a partir de los vectores recombinantes en la célula diana.

Para que la terapia génica tenga éxito, se debe entregar una cantidad adecuada de un gen terapéutico a la célula diana sin causar efectos secundarios tóxicos.

Cada sistema de vector viral se caracteriza por un conjunto inherente de propiedades que afectan a su idoneidad para aplicaciones específicas de terapia génica.

Para algunos trastornos, la expresión a largo plazo de una proporción relativamente pequeña de las células sería suficiente (por ejemplo, trastornos genéticos), mientras que otras patologías pueden requerir alta proporción para la expresión génica. Por ejemplo, las terapias de genes diseñados para inhibir el crecimiento de células cancerosas mediante la reconstitución de los genes supresores de tumores inactivados pueden requerir la transferencia génica en una gran fracción de las células anormales. (*Mark et al., 2001*).

Los vectores virales pueden ingresar fácilmente a las células y administrar sus genes en la célula diana, por lo cual son más eficientes que los sistemas de entrega no viral. La mayoría de los vectores virales utilizados son derivados de patógenos, de los cuales se eliminan genes virales para hacerlos no patógenos. Estos virus tienen un amplio tropismo por lo que pueden infectar y entregar material genético a un gran número de células y tejidos. En la siguiente Tabla 1 se pueden observar los vectores virales más utilizados. (*Goverdhan et al., 2005*)

Tabla 1 Vectores virales más utilizados en terapia génica

Vector viral	Capacidad de clonación	Tropismo	Limitaciones	Ventajas
Retrovirus	8 kb	Células en división	Puede inducir oncogénesis	Expresión génica estable
Lentivirus	8 kb	Amplio	Toxicidad	
Herpes simple -1	150 kb	Amplio y neuronas		
Adenovirus	30 kb	Amplio	La cápside causa respuesta inflamatoria	Alta eficiencia de transducción

1.2 Transfección celular con lípidos catiónicos.

Es un método para transportar e introducir material genético en células eucariotas, mediante un sistema que lo proteja, en este caso liposomas catiónicos, los cuales son vesículas esféricas con una bicapa de fosfolípidos rodeada de partes hidrosolubles en su exterior e interior que da protección al material genético de ser degradado. En terapia génica se introduce el material

genético dentro del liposoma para entrar en la célula por endocitosis. Presenta alta eficiencia y baja toxicidad. (*Romero et al., 2001*).

La entrega de genes mediada por vectores no virales, tratan de eludir a los problemas de seguridad que pueden ocasionar los vectores virales. En estos vectores no virales se forma un complejo que lleva el gen terapéutico con moléculas que ayudarán a que entre a la célula diana. Este DNA se une a la membrana celular, el complejo está contenido en una endosoma el cual resiste a que sea destruido por enzimas lisosomales, esta característica es muy importante ya que da el éxito al vector no viral.

La mayoría de los sistemas de vectores no virales usan lípidos catiónicos como vehículo, ya que se ensamblan en vesículas que son atraídas por las membranas celulares. Otros sistemas de vectores no virales utilizan de vehículo algunos polímeros como el poli-L-lisina (PLL) los cuales son más eficientes que los lípidos catiónicos, pero uso está restringido debido a su toxicidad. (*Schatzlein, 2001*).

1.3 Glicoproteínas fusogénica víricas

Las glicoproteínas fusogénicas víricas (F) son proteínas integrales de membrana que atraviesan la bicapa de lípidos en los virus con envoltura, las cuales tienen la función de unirse a células diana. (Figura 1) (Murray et al., 2009).

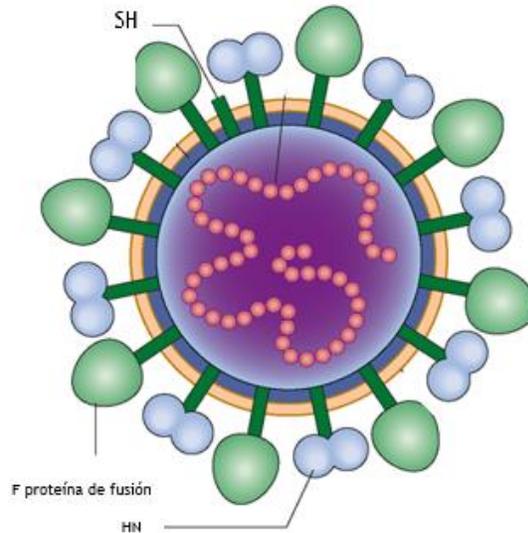


Figura 1 Paramyxovirus SV5. Se señalan las proteínas integrales de la envoltura, entre ellas la neuraminidasa (HN) y la glicoproteína de fusión (F)

En la mayoría de los casos la expresión de glicoproteínas fusogénicas víricas en cultivo celular tiene como consecuencia la formación de masas de células fusionadas, denominadas sincitios y la consiguiente muerte celular. (Gómez-Treviño et al., 2005)

Las glicoproteínas fusogénicas víricas clonadas conservan la capacidad de inducir la formación de sincitios. En los últimos años muchas de las

glicoproteínas fusogénicas víricas han podido ser clonadas lo cual ha permitido estudiar no sólo su mecanismo de acción, sino las consecuencias de su sobreexpresión tanto *in vitro* como *in vivo*.

Paterson en 1985 describió, que la expresión del cDNA de la proteína F del virus SV5 en cultivo celular, permite la expresión de una proteína F funcional que al igual que la que se produce en la infección por el virus silvestre, y que la expresión de dicho cDNA da lugar a la formación de sincitios.

Heminway y colaboradores en 1994 describieron la necesidad de expresar conjuntamente las proteínas F, G y SH de la envuelta del virus respiratorio sincitial (RSV) para conseguir una extensiva formación de sincitios paralela a la obtenida por la infección de una monocapa celular con el virus salvaje. A diferencia de lo que sucede con la mayoría de miembros de la familia *Paramyxoviridae*, la glicoproteína fusogénica F de SV5, es fusogénicamente activa y permite la fusión celular sin requerir la co-expresión de la proteína de unión (HN) y así lo han demostrado numerosos estudios (*Horvath et al., 1992; Bagai y Lamb, 1995; Dutch, 1998*).

1.3.2 Propiedades de las glicoproteínas fusogénicas víricas

Las proteínas de fusión viral varían en su modo de activación y en la clase estructural. Estas características se combinan para producir muchos mecanismos de fusión diferentes. Las proteínas de fusión de los paramixovirus pertenecen a la clase I, las cuales presentan casos especiales en los cuales el receptor se comunica del pico viral de cada glicoproteína a otra. Las

glicoproteínas fusogénicas se escinden proteolíticamente para generar dos dominios ligados por un puente disulfuro, los cuales son trímeros metaestables.

(Figura 2)

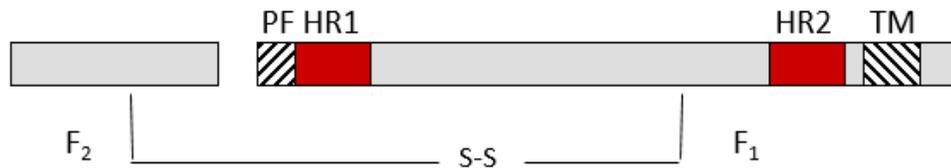


Figura 2 Proteína F del Paramixovirus

La proteína F del Paramixovirus consta de dos dominios unidos por un puente disulfuro, llamados F1 y F2. El dominio F1 se encuentra anclado de manera transmembrana, mientras que en el extremo N-terminal se ubica el péptido de fusión, el cual es el responsable de la fusión celular, ya que al cambiar de conformación queda expuesto para fusionarse, esto ocurre a un pH neutro.

A pesar de las diferencias entre los mecanismos de fusión, se rigen por principios comunes, en respuesta a un disparador de activación, la proteína de fusión metaestable se convierte en un prolongado, en algunos casos la estructura en forma de varilla, que se inserta en la membrana diana a través de su péptido de fusión. Un cambio conformacional posterior hace que la proteína de fusión se doble sobre sí misma, con lo que su péptido de fusión y su dominio transmembrana se ponen en contacto con la membrana de la célula hospedadora. La fusión se produce a medida que el tallo lipídico inicial avanza a

través de la hemifusión local, y luego se abre y agranda un poro de fusión.
(*Earp, et al., 2005*)

Justificación

Nuestra propuesta es entonces, un estudio del proceso de fusión celular expresando la proteína fusogénica vírica del SV5. En el presente estudio se plantea la construcción de un vector plasmídico de expresión para la glicoproteína fusogénica de membrana (F) del SV5 el cual permitirá conocer el tiempo en que ocurre la formación de poros en la membrana, siendo aplicable en estudios donde se requiera una permeabilidad aumentada de la membrana celular.

Capítulo II

ANTECEDENTES

En un estudio realizado por *Gómez-Treviño en el 2003*, se observó la citotoxicidad y la fusión celular causada por la glicoproteína fusogénica viral con células tumorales.

Las glicoproteínas de los virus con envoltura permiten la unión de los virus con las células diana. La proteína fusogénica (F), presenta un efecto de fusión de las membranas cuando se expresa en células en cultivo; este proceso desencadena la aparición de masas de células fusionadas, denominadas sincitios, así permiten conducir a la muerte celular a causa de trastornos metabólicos y lisis de la membrana citoplasmática.

También se construyó un adenovirus no replicativo para la expresión de la glicoproteína fusogénica en células tumorales. En dicho estudio se investigaron tres aspectos importantes: la citotoxicidad, el efecto bystander y la fusión celular provocados por esta glicoproteína fusogénica viral, empleando tres líneas celulares tumorales y efectuando diferentes técnicas microscópicas e inmunológicas.

La inducción a la formación de sincitios se observó a las 48 horas postinfección, los cuales pierden viabilidad progresivamente. Se demostró también que la

expresión de esta glicoproteína posee un potente efecto bystander hasta 1:100 sobre células no transducidas.

Dichos resultados indican que la sobreexpresión de la glicoproteína F del Paramyxovirus SV5 induce la muerte celular por alteración de la estructura de la membrana celular y la formación de sincitios, lo cual puede utilizarse en la eliminación de células tumorales.

Registros sobre la actividad y uso terapéutico de estas glicoproteínas establecen que la proteína fusogénica del virus SV5 aun siendo clonada para mejorar su expresión en vectores adenovirales recombinantes, no solo mantiene su actividad biológica, sino que además prescinde de la participación de otras moléculas inductoras de la fusión de membranas. Esto hace que se profile como una buena opción para su uso como agente eficaz con actividad en la terapia génica del cáncer basada en el empleo de genes citotóxicos. Además, se ha comprobado que, al ser empleada conjuntamente con terapias basadas en la activación de pro-drogas, se incrementan significativamente los porcentajes de eficiencia de eliminación de tejido tumoral (*Gómez-Treviño et al, 2003*).

Con anterioridad al inicio del interés por los estudios que se proponen en este proyecto, *Guedan y colaboradores en el 2008* demostraron que la proteína fusogénica del virus de leucemia de gibones GALV, expresada en etapas tardías del proceso de replicación de un adenovirus recombinante (72 horas), interfiere con la efectividad de este mismo vector de expresión.

Estudios más recientes demuestran el uso de glicoproteínas de fusión víricas empleadas junto con tratamientos con fármacos aplicados en terapia contra el cáncer.

Uno de ellos señala que todavía no existen tratamientos eficaces para el cáncer superficial de vejiga. Después del tratamiento, el 20% de los pacientes todavía desarrollan la enfermedad metastásica por lo cual *Simpson en el 2012* ha demostrado el control local del tumor mediante la combinación de oncolisis con la expresión de un gen activador de pro fármaco muy potente y la glicoproteína fusogénica.

El tratamiento de siete líneas de células neoplásicas de vejiga con el virus dio lugar a ocasionar oncolisis, en conjunto con la activación de profármacos y la glicoproteína de fusión. Oncovex GALV/CD y mitomicina C mostraron un efecto sinérgico, mientras que la co-administración con cisplatino o gemcitabina mostró un efecto antagonista in vitro. Resultados de pruebas in vivo mostraron que el tratamiento intravesical con Oncovex GALV/CD p profármaco (5-FC) redujo el volumen medio del tumor en más del 95% en comparación con los controles.

Detu y colaboradores en el 2013 estudiaron la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) ya que puede promover la formación de sincitios multinucleados para matar las células de una manera dependiente del pH, para ello diseñaron un sensor de pH de VSV-G y de esta manera se generó una nueva VSV-G mutante que promueve eficazmente la formación de sincitio en el pH extracelular del tumor. (Figura 3)

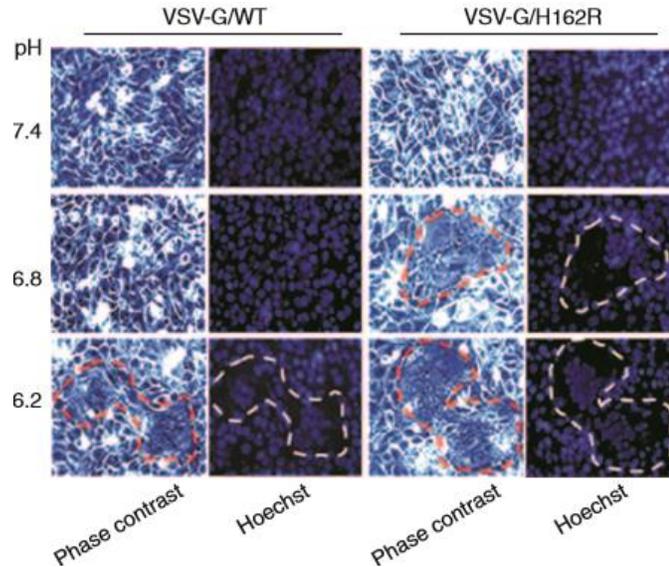


Figura 3 Formación de sincitios entre células madre neurales

Formación de sincitios entre células madre neurales expresando VSV-G silvestre y VSV-G/ H162R (mutante), a diferentes pH. (Detu et al 2013)

La fusión de la membrana es esencial tanto para la entrada viral como para la fusión de células. A pesar de que existen diferencias importantes entre la célula vírica y la fusión de la membrana celular, se conservan muchos aspectos. Los paramixovirus usan generalmente dos glicoproteínas de la envoltura para producir la fusión de la membrana. Se reconocen varios pasos importantes durante la fusión de la membrana de célula viral. Los primeros pasos incluyen: unión de la proteína de unión HN / H / G a su receptor de superficie celular afín, la activación resultante de la proteína HN / H / G para someterse a su propio reordenamiento conformacional y el posterior desencadenamiento de la proteína F, para posteriormente experimentar reordenamientos

conformacionales extensos que resultan en la fusión de membrana. Los pasos posteriores en el proceso de fusión de membrana incluyen la formación y expansión de poros de fusión (*Aguilar et al, 2016*). Es de destacar, aunque estas son etapas de fusión de membrana muy bien reconocidas, pueden quedar por descubrir etapas adicionales en este proceso complejo

Estos hallazgos pueden ofrecer una visión de las relaciones evolutivas entre los géneros Paramyxoviridae y ofrecer información para el desarrollo profiláctico y terapéutico.

Tomando esto como antecedente, se puede observar que no existe una manera para advertir de manera precisa, en términos de tiempo, para relacionar la presencia de proteínas fusogénicas en el entorno celular, y la formación de sincitios. Establecer parámetros, o en caso óptimo, poder cronometrar de manera fiel un proceso de fusión celular, permitiría obtener información valiosa en su conocimiento, y abonar al expediente de la postulación de las proteínas fusogénicas como biomoléculas útiles en la terapia génica del cáncer.

Aportación científica

Estudio del proceso de fusión en una línea de tiempo, que permita revelar como ocurren las etapas del proceso para su posible aprovechamiento.

a) Vencer la barrera de resistencia multidrogas.

b) Detener la administración de fármacos y permitir que los sincitios inicien la destrucción de tejido tumoral.

Hipótesis

Los vectores de expresión de proteínas fusogénicas permiten visualizar el tiempo en que ocurre una fusión celular.

Objetivos

-Objetivo general

Producir vectores de expresión de proteínas fusogénicas víricas para estudio del tiempo en que ocurre una fusión celular.

-Objetivos particulares

- Propagar el vector de expresión mediante transformación en *E. coli*.
- Aislar y purificar el vector de expresión.
- Transfectar células tumorales en cultivo con el vector plasmídico empleando lípidos catiónicos.
- Relacionar la aparición de inmunodetección mediante imágenes y cuantificación de LDH liberada por la formación de poros en la membrana con el progreso del proceso de fusión celular.

Capítulo III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Propagación de vector plasmídico pACC-F en *E. coli*

3.1.2 Preparación de células de *E. coli* calcio competentes

Se prepararon las células calcio - competentes por el método de (*Sambrook, et al, 2001*). A partir de un cultivo axénico de la cepa *E.coli* HB101 K12 de Bio-Rad se tomó una colonia y se sembró en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de caldo LB a 37°C con agitación durante 3 horas hasta que alcanzó una densidad óptica de 5×10^7 células/ml, a una longitud de onda de 600 nm. Se transfirieron 50 ml del cultivo a un tubo estéril y se dejó en hielo por 10 min para inhibir el crecimiento bacteriano. Posteriormente se centrifugó a 4100 rpm por 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se le agregaron 30 ml de solución fría de MgCl₂ 80 mM y CaCl₂ 20mM, se agitó en vortex para resuspenderlas y nuevamente se centrifugó a 4100 rpm por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se agregó 2 ml de solución fría de CaCl₂ 0.1 M y finalmente se resuspendió y se guardó a -20°C. (*Serrano-Rivero, et al., 2012*)

3.1.3 Transformación química de *E. coli* con el vector pACC-F

El plásmido pACC-F contiene el promotor constitutivo del Cytomegalovirus (CMV), por lo cual se seleccionó como vector de expresión para células de mamífero. Cabe mencionar que el plásmido utilizado fue obtenido por un trabajo anterior ya con el inserto de la glicoproteína fusogénica F. (Figura 4)

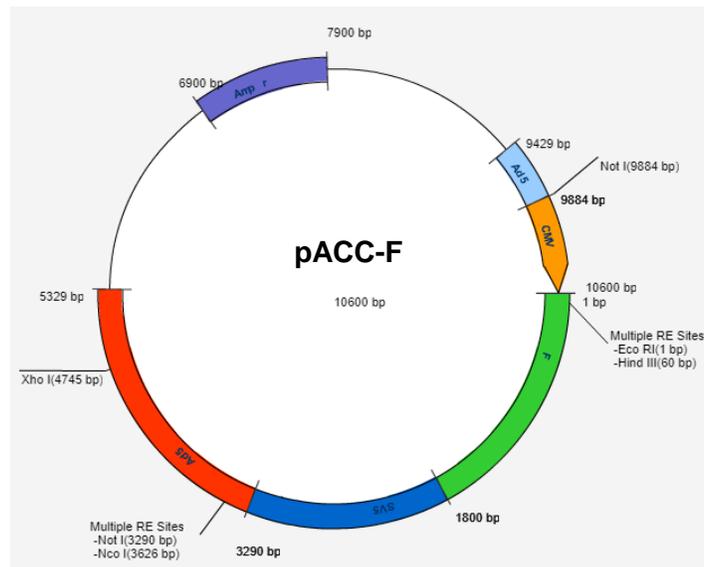


Figura 4 Plásmido pACC-F mostrando algunos de sus sitios de restricción.

Se transformó la cepa de *E. coli* HB101 con el plásmido pACC-F, por medio del método químico con células calcio competentes. Para seleccionar las clonas positivas se utilizó medio LB con ampicilina, con sus respectivos controles, el positivo en LB y el control negativo de la cepa sin el plásmido en LB/ampicilina. (Sambrook, et al, 2001).

3.2 Comprobación de F en el vector plasmídico

Se realizó la amplificación de la secuencia que codifica para la Glicoproteína Fusogénica (F) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers (primer forward: 5'-AAGAATTCATGGGTACTATAATTCAATTTCTG-3 y primer reverse: 5'-AAGGTACCTCTTGTTC CAAGAGTTGCAG-3'). Se empleó como reactivo el premix de Taq DNA polimerasa, dNTP's, MgCl₂ y buffer: GoTaq® Green Master Mix de Promega. Las condiciones en que se realizó la PCR se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 2 Reactivos de la PCR

Reactivos	Volumen	Concentración final
Go Taq 2X	12.5 µl	1X
Primer forward 10µM	2.0 µl	1.0 µM
Primer reverse 10µM	2.0 µl	1.0 µM
DNA	1 µl	99.4ng
Agua libre de nucleasas	7.5 µl	N.A.

Tabla 3 Condiciones de la PCR

Ciclos	Temperatura/Tiempo
Inicial	94°C/2 min
Desnaturalización Alineamiento Elongación	94°C/0.45 min 55°C/0.45 min 72°C/1 min
Final	72°C/10 min

} 25 ciclos

Se comprobó la amplificación de la secuencia mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 75 volts por 35 min. Se utilizó un marcador de peso molecular de 3000 pares de bases (bp). El fragmento de la glicoproteína fusogénica F tiene un peso molecular de 1800 bp.

3.3. Aislamiento y purificación del vector pACC-F

Se tomó 1 mililitro de cultivo de la clona correcta en medio LB/ampicilina, y se mezcló con glicerol estéril al 30% en proporción 1:1 para su conservación en congelación a -20°C.

Para su purificación se tomó un mililitro del cultivo y se inoculó en 100 ml de medio LB/ampicilina en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se incubó 16 horas a 37°C con agitación a 200 rpm.

Una vez obtenido el crecimiento del cultivo, se empleó el kit Maxi-prep GF-II de Q-Biogene para extraer el plásmido. Posteriormente se verificó su calidad y concentración por medio de espectrofotometría UV-Vis. Se dispensó en viales la solución de DNA plasmídico a una concentración de 1 µg/ml y se guardó en congelación a -20°C

3.4. Transfección celular con lípidos catiónicos

Se utilizó la línea celular BpRc1 CRL-2217™ de ATCC, la cual son células tumorales de hígado de ratón, presentan morfología epitelial y crecen de manera adherente. Fueron cultivadas con condiciones óptimas para su

crecimiento, entre ellas una temperatura de 37°C, en estufa de humedad controlada y 5% de CO₂, en medio Eagle modificado y suplementado con suero bovino fetal.

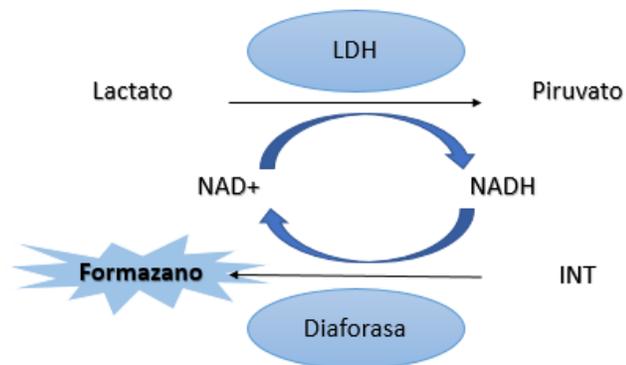
La transfección se realizó empleando lípidos catiónicos, la cual se basa en la formación de complejos entre los lípidos catiónicos y el DNA, dichos complejos tienen afinidad por la membrana celular, así permiten la entrada del DNA al citoplasma.

Se utilizó el agente TransFectin Lipid de BIO-RAD, y se siguió el protocolo de transfección para células adherentes. Se tenían tres placas de ocho pocillos con un número aproximado de células de 1×10^4 y con un 80% de confluencia. Se emplearon 50 µl del agente TransFect y 200 ng de DNA, se mezclaron en vortex. Posteriormente se agregó la mezcla a 5 ml de medio, a partir de ahí se tomaron alícuotas de 200 µl para transfectar cada pocillo, respetando el control de células sin tratamiento. Se incubó 30 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Pasados los 30 minutos se agregó suero bovino fetal y 500 µl de medio adicional a cada pocillo. Se dejó incubando para realizar muestreos por duplicado a las 12, 15, 18, 21, 24, 36, 48 y 64 horas, dichos muestreos se realizaron en campana de cultivo celular, tomándose 500µl por pocillo en cada muestreo, para transferirse a un tubo eppendorf de 1.5 ml para llevarse a congelación, estos muestreos se realizaron con la finalidad de cuantificar la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Además, a cada muestreo programado, se agregó 500 µl de paraformaldehído (PFA) 1%, con la finalidad de fijar las células al pocillo y realizar inmunodetección de F.

3.5 Cuantificación de LDH

Se realizó el ensayo citotóxico colorimétrico cuantitativo CytoTox 96 Non-radiactive de Promega. El ensayo permite medir cuantitativamente la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable la cual se libera al ocurrir lisis celular, en este caso por tratamiento con el vector plasmídico y así calcular el porcentaje de citotoxicidad. La liberación de LDH de células dañadas cataliza la oxidación de lactato a piruvato la cual permite la obtención de NADH que realiza en presencia de la enzima diaforasa, la conversión de una sal de tetrazolio en este caso el idonitrotetrazolio violeta (INT), en un producto rojo llamado formazano. (Figura 5)

El formazano es proporcional a la cantidad de LDH liberada, dicho compuesto químico se lee su absorbancia a una longitud de onda de 490 nm por



espectrofotometría UV-Vis

Figura 6 Esquema de la disposición de los ensayos en la placa de 96 pocillos

En la figura se muestra el pocillo A1 como blanco, A2, A3 y A4 como medio, A5, A6 y A7 como control de células sin tratamiento y A8, A9 y A10 controles de máxima liberación de LDH. Las filas de la B a la H corresponden a los muestreos realizados, siendo de la columna 1 a 3 el triplicado de un muestreo y del 4 al 6 el triplicado de su duplicado.

3.6 Análisis de la capacidad fusogénica y formación de sincitios mediante microscopía de contraste de fases, microscopía de fluorescencia y microscopía confocal.

Para analizar la fusión celular debida a la expresión de la proteína F mediante microscopía de fluorescencia se prepararon cultivos de células BpRc1 CRL-2217™ de ATCC, las cuales se hicieron crecer en cámaras de cultivo montadas sobre portabjetos de vidrio de 8 pozos (Chamber Slide System, Nalge Nunc). Se colocaron 1×10^4 células/pozo. Las células fueron transfectadas con 200 ng del plásmido pACC-F empleándose 50 μ l de lipofectinas (TransFect, reagent). Se mezclaron los componentes en vortex y se agregó la mezcla a 5 ml de medio Eagle modificado. Se tomaron alícuotas de 200 μ l para transfectar cada pozo. Las condiciones de transfección fueron una incubación de 30 minutos a

37°C con atmósfera de CO₂ al 5%. Pasados los 30 minutos se agregó 500 µl de suero bovino fetal y de medio a cada pozo. Se dejó incubando para realizar muestreos por duplicado a las 12, 15, 18, 21, 24, 36, 48 y 64 horas en los cuales, como se mencionó en el apartado 3.4 *Transfección celular con lípidos catiónicos*, luego de tomar 500 µl de medio para realizar la cuantificación de liberación de LDH, se fijaron las células con 500 µl PFA 1% y lavadas con buffer de fosfatos (PB) 0.1 M

A las 64 horas postinfección terminando los muestreos, se realizaron tres lavados con PB 0.1 M, seguidamente se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.05% por 10 minutos y fueron bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PB 0.1 M por espacio de 30 minutos. Posteriormente, tanto las células transfectadas como los controles negativos de transfección fueron incubados en presencia del anticuerpo monoclonal anti-F, a una dilución 1:100 en BSA 3%, por espacio de 1 hora a 37 °C. A continuación, las monocapas fueron lavadas 3 veces con PB 0.1 M - BSA 3% durante 10 minutos y enfrentadas durante 1 hora a 37 °C al anticuerpo secundario *anti-mouse* Cy2 IgG (Amersham), a una dilución 1:75 en BSA 3%; finalmente se realizaron 3 lavados con buffer de fosfato salino (PBS) de 5 minutos cada uno.

Estas mismas preparaciones fueron sometidas a un doble marcaje con yoduro de propidio (IP) para teñir los núcleos. Con este propósito las células fueron tratadas con RNasa A (Amersham) a una concentración de 10 mg/ml durante 10 minutos, posteriormente fueron tratadas durante 15 minutos a 37 °C con una solución de IP recién preparada con la siguiente composición: a 10 ml de Tritón

X-100 (Sigma) 0.1% en PBS añadir 2 mg de RNasa A libre de DNasa (Sigma) y 200 μ l de IP 1mg/ml (Molecular Probes). Por último, sobre cada portaobjetos se colocó medio orgánico de montaje permanente y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se empleó un microscopio Leica, DMRB FLUO/METAMORPH (Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Barcelona). Se obtuvieron imágenes de las muestras con doble marcaje en un mismo plano focal, las cuales fueron registradas a través de diferentes canales y posteriormente superpuestas. Las longitudes de onda de absorción (A) y emisión (E) empleadas fueron las correspondientes a los picos máximos en los espectros de excitación/emisión respectivos, siendo A=535 nm y E=617 nm para las secuencias de imágenes tratadas con yoduro de propidio, y A=492 nm y E=510 nm respectivamente, para las obtenidas con marcaje de cianina 2.

Las disposiciones de residuos generados en los experimentos fueron tratados de acuerdo con el Procedimiento para la Disposición Final de Residuos Peligrosos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en donde los geles de agarosa fueron dispuestos en el colector G: Combinaciones Orgánicas Sólidas, el TAE 1X fue dispuesto en el colector A: Soluciones Salinas de pH 6-8, Sales, Ácidos y Bases Orgánicas. Los residuos de colorantes como Cristal Violeta, Lugol y Safranina fueron destinados al colector de Colorantes y Lugol. Los guantes utilizados en los experimentos fueron depositados en el bote de Basura Industrial. Respecto al material biológico generado como medios de cultivo y el material en contacto como

puntillas, matraces y tubos fueron tratados como Residuo Peligroso Biológico Infeccioso, esterilizado durante 15 min a 121°C con 15 libras de presión.

Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Transformación del vector plasmídico en *E. coli*

Se transformó el plásmido pACC-F en *E. coli* HB101. En la siguiente figura se muestran imágenes de la caja con colonias transformadas las cuales presentan resistencia a ampicilina, además de sus controles. (Figura. 7)

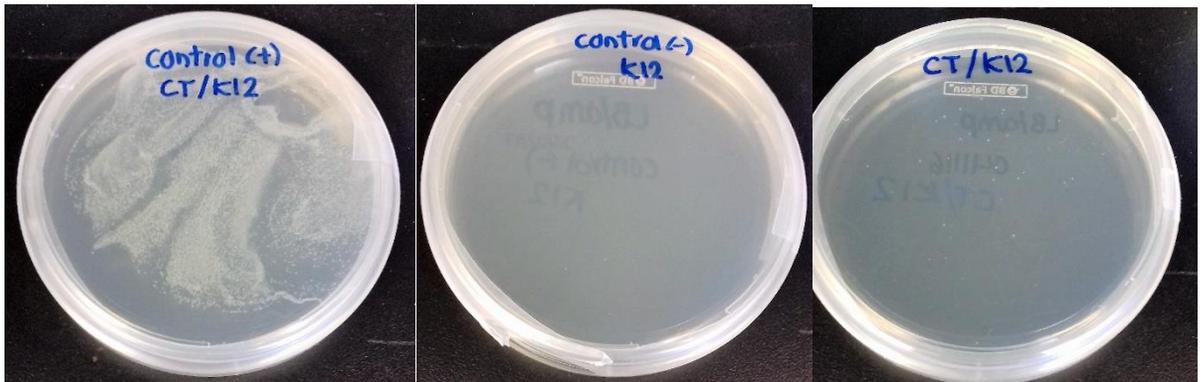


Figura 7 Selección de clonas transformadas. Imagen izquierda: control positivo en agar LB, imagen del centro: control negativo en agar LB/ampicilina e imagen derecha: 23 clonas transformadas en agar LB/ampicilina

4.2 Comprobación de F en el vector plasmídico

Se obtuvo una banda en 1800 pares de bases, correspondiente al tamaño del gen la Glicoproteína Fusogénica.

Además, se observaron bandas de 10.5 kb correspondientes al DNA plasmídico. (Figura 8)

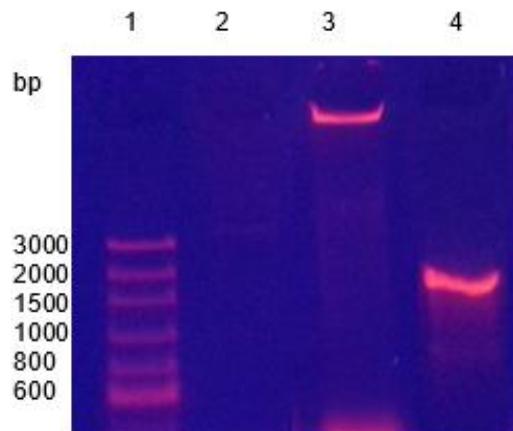


Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa al 1%, 75 volts, 35 minutos. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2 control negativo sin DNA, carril 3 DNA plasmídico pACC-F de aproximadamente 10.5 kb y carril 4 gen de la Glicoproteína Fusogénica de 1800 pb

Al no requerir la expresión de otras proteínas integrales de unión, esta es una de las principales razones por la cual puede ser empleada la glicoproteína fusogénica vírica del SV5 para estudiar el proceso de fusión celular, además de tener aplicaciones en terapia para atacar células tumorales.

En este trabajo la proteína F es capaz de hacer fusión a pH neutro y a 37°C. A pesar de tener antecedentes que prueban la diferencia entre fusión virus- célula y célula- célula, siendo más lenta en célula- célula no coarta el objetivo de estudiar el proceso de fusión celular, además que una de las principales aplicaciones para las cuales se han utilizado las proteínas fusogénicas es en terapia génica. Las glicoproteínas fusogénicas virales son candidatas para la terapia génica de tumores sólidos porque provocan la fusión celular, lo que lleva a la formación de sincitios letales. (*Higuchi et al., 2000*)

4.3 Aislamiento y purificación del vector plasmídico

Una vez comprobada la correcta inserción del gen de interés en el vector plasmídico, se purificó y se calculó su concentración por medio de espectrofotometría UV-Vis obteniéndose una concentración de 1 µg/ml y una relación OD 260/280 de 1.8.

4.4 Transfección celular

Se utilizaron 50 µl del agente TransFect (lípidos catiónicos) y 200 ng de DNA para crear los liposomas, los cuales se agregaron a 5 ml de medio para cultivo celular y de ahí se tomaron alícuotas de 200 µl para transfectar cada pocillo.

Cabe señalar que uso la mínima cantidad de DNA plasmídico para crear los liposomas ya que las proteínas fusogénicas presentan un efecto bystander o efecto espejo. (*Freeman et al., 1993*). Este efecto consiste en la pérdida de viabilidad en las células no transfectadas después de la muerte de las células

transfectadas (*Vile et al., 1999*). El efecto se ha visto en ensayos in vitro y se presume que es más fuerte en in vivo, por acción del sistema inmune. Este efecto bystander es muy importante ya que al tener bajo rendimiento de transfección del vector plasmídico, expresión de la proteína F y su activación del péptido de fusión para desencadenar la fusión celular, puede aumentar la muerte celular.

4.5 Cuantificación de LDH

Las células transfectadas con el plásmido pACC-F presentaron disminución de su porcentaje de viabilidad. Se calculó su porcentaje de citotoxicidad siendo el cociente de la absorbancia experimental entre el control de máxima absorbancia, multiplicado por cien. Para las primeras 12 horas ya se presentaba un 22% de citotoxicidad, alcanzando un 56% a las 21 horas se vio una ligera disminución paulatina a las 24, y 36 horas, manteniéndose igual hasta las 48 horas, para finalmente a las 64 horas obtener aproximadamente de un 67% de pérdida celular. En la siguiente tabla se muestran los tiempos con su respectivo promedio de absorbancias y porcentaje de citotoxicidad. (Tabla 4).

Tabla 4 Relación de tiempo con porcentaje de citotoxicidad promedio

Tiempo	Absorbancia promedio	Citotoxicidad
12 horas	0.22	22.35%
15 horas	0.21	21.41%
18 horas	0.34	34.35%
21 horas	0.56	56.24%
24 horas	0.52	51.53%
36 horas	0.36	35.88%
48 horas	0.36	36%
64 horas	0.67	66.94%

En la Figura 9 se muestra el gráfico de barras del porcentaje de citotoxicidad, con sus desviaciones estándar.

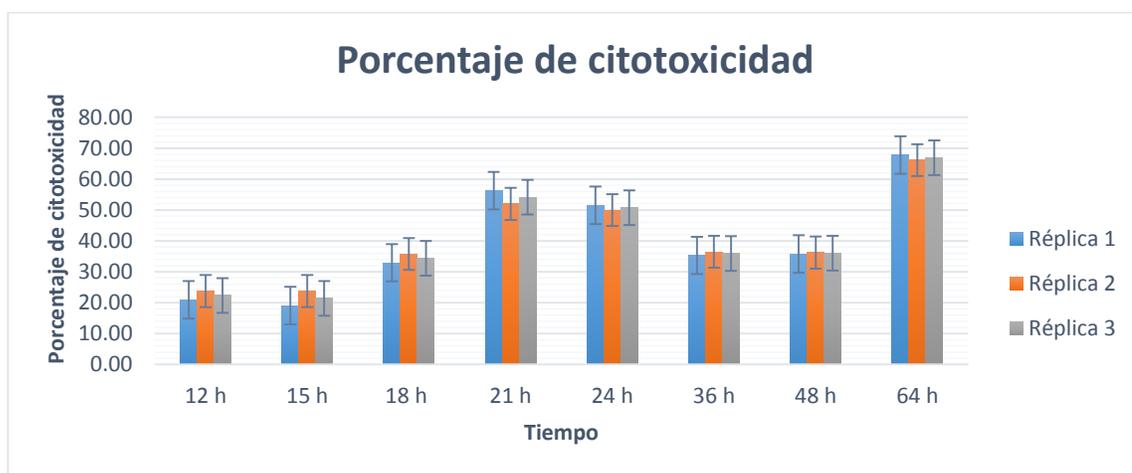


Figura 9 Gráfico de porcentaje de citotoxicidad

El principio de medir la actividad de LDH de sobrenadantes de cultivo celular como una medida de citotoxicidad se aplicó con éxito a varias combinaciones de células efectoras como macrófagos, monocitos, células T citotóxicas y células tumorales. Los ensayos de liberación de LDH son un medio apropiado y posiblemente preferible para medir las reacciones citotóxicas celulares. El ensayo de liberación de LDH combina las ventajas de la fiabilidad y una simple evaluación comparados con otros ensayos como los radioisótopos. (*Decker, et al., 1988*).

A pesar de ser una buena herramienta para medir citotoxicidad, se encuentra información que el ensayo de cuantificación de LDH no es apropiado en algunos casos, como en un estudio para evaluar la toxicidad de nanopartículas de Cobre, Plata y dióxido de titanio, las cuales tenían el potencial de inactivar y otras de absorber la LDH. También es el caso en el cual factores de algunos tipos de células tumorales llegan a inactivar la enzima LDH después de 24 horas de su liberación al medio de cultivo. (*Han, et al., 2011*).

4.7 Inmunomarcaje, microscopía de contraste de fases, microscopía de fluorescencia y microscopía confocal.

Una vez realizado el inmunomarcaje, se tomaron micrografías por microscopía de fluorescencia. En estas imágenes se puede apreciar de manera consecutiva diversas etapas del proceso de fusión celular.

En las primeras horas se observan las células adherentes sin deformaciones, pero a partir de las 12 horas se pueden observar áreas de células fluorescentes (Figura. 11, #3) lo que indica la expresión de las proteínas F en la membrana celular. Para las 24 horas se observa un aumento en esta fluorescencia, a las 36 horas esta fluorescencia es mayor debida al aumento en la formación de poros en la membrana. Este resultado se puede cotejar a la liberación de la enzima LDH, de tal manera que, aumentando la cantidad de poros en la membrana, se ve aumentada la liberación de la misma enzima. Siendo a las 48 horas post-infección la notable formación de sincitios, producto de la fusión entre algunas células.

En la Figura 11 se puede apreciar algunas de las etapas del proceso de fusión celular, siendo de principal interés para este estudio, las ocurridas dentro de las primeras 36 horas ya que en ella ocurre la expresión de la glicoproteína fusogénica la cual al cambiar de conformación empieza la formación de poros en la membrana por lo que se pudiera aprovechar para vencer la barrera de resistencia multidrogas.

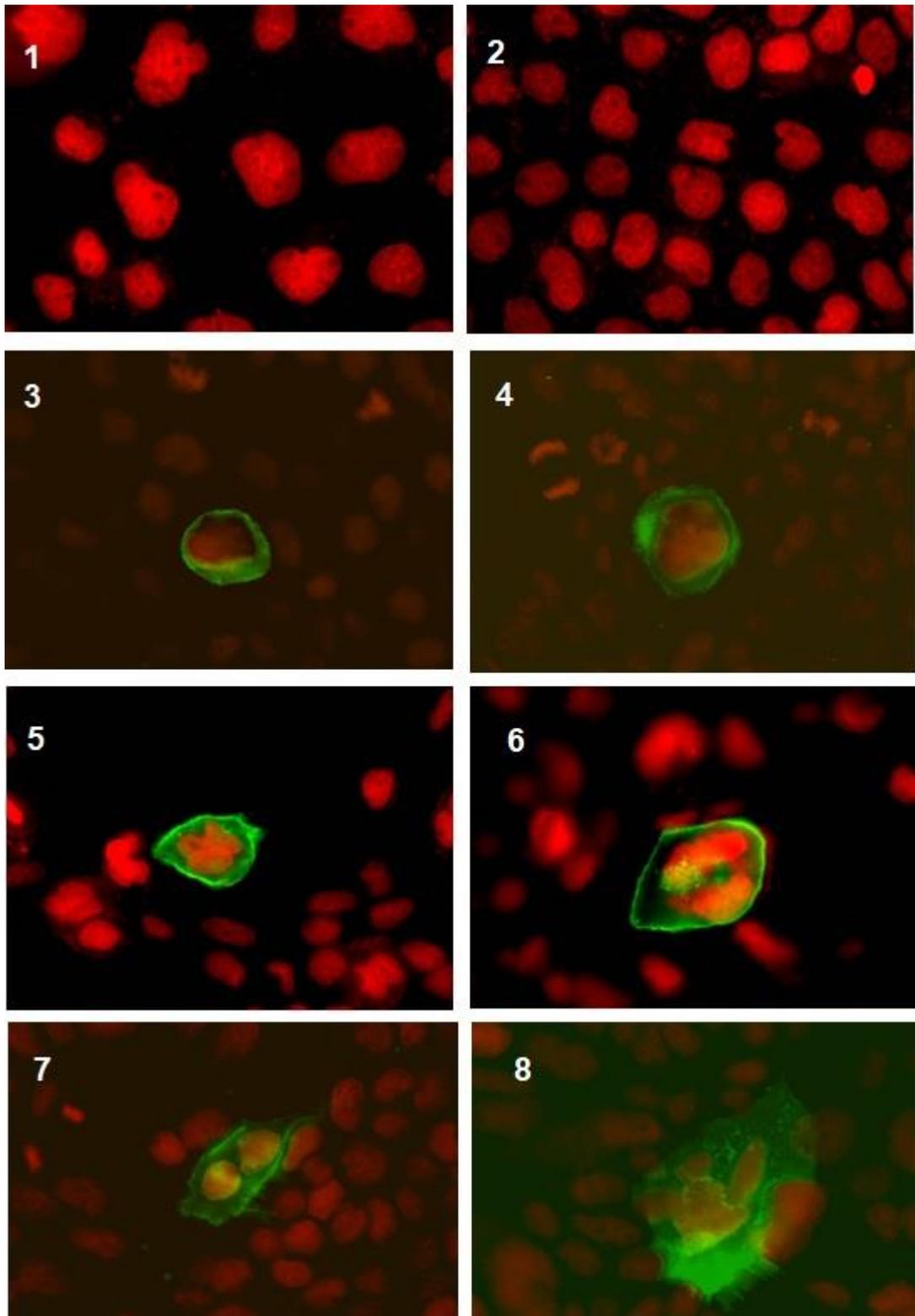


Figura 10 Imágenes de microscopía de fluorescencia. 1) Control sin tratamiento 0 h, Células transfectadas: 2) 0 h, 3) 12 h, 4) 18 h, 5) 24 h, 6) 36 h, 7) 48 h, 8) 64 h

Muchos virus inducen la muerte celular activando la fusión celular, iniciado a partir de la interacción de la glicoproteína fusogénica con los receptores celulares. El proceso termina con fusiones entre las células infectadas por el virus y además otras células no infectadas. (*Tan, et al. 2009*)

En otros estudios realizados por *Zhu y colaboradores en el 2014* se observó in vitro la destrucción de cáncer de pulmón usando un vector plasmídico recombinante del virus del herpes simple tipo I (HSV-I) con la glicoproteína fusogénica del virus de leucemia del mono Gibbon, (GALV.fus) teniendo dos variantes un vector controlado por el promotor del citomegalovirus (CMV) y otro por el promotor UL38p.

Se transfectó la línea celular A549 (adenocarcinoma de pulmón) para observar la expresión y los efectos de la glicoproteína fusogénica (GALV.fus). Dicha expresión se confirmó por Western Blot y los efectos de GALV.fus fueron observados tiñendo las células con azul de tripano para contar las células viables mediante el microscopio invertido. Se compararon los resultados y encontraron que las células tratadas con el plásmido con el promotor del CMV causan fusión celular en las células en proliferación y en las quiescentes, en cambio las células tratadas con el plásmido con el promotor UL38p solo induce la fusión en células que se encuentran en proliferación. (Fig. 11)

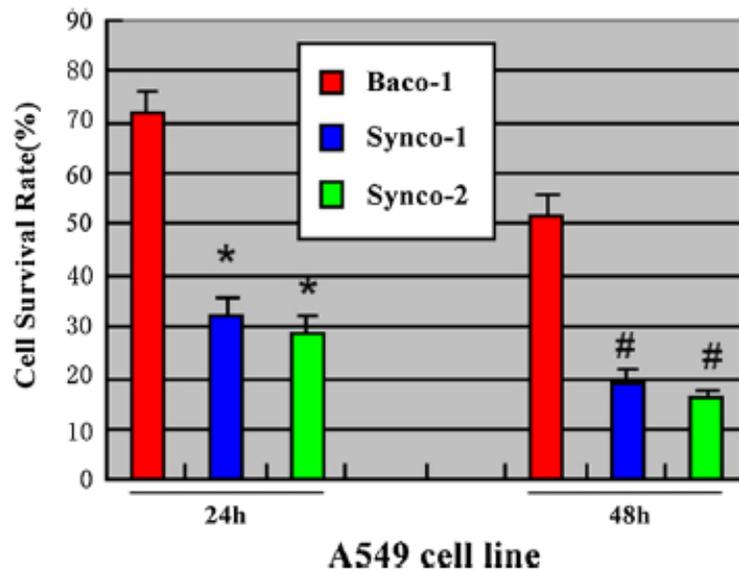


Figura 11 Efectividad fusogénica de vectores plasmídicos de expresión de GALV.fus. (Jones, et al. 2005)

En la gráfica se compara el porcentaje de células viables por Baco-1 (HSV-1 recombinante no fusogénico), Synco-1 vector fusogénico con promotor CMV y Synco-2 (vector fusogénico con promotor UL38p). El promotor UL-38P es específico para células tumorales por lo tanto el GALV.fus solo se expresó en tumores (Jones, et al. 2005). Cabe mencionar que las células tratadas con vector no fusogénico presentan cambios morfológicos.

En el estudio realizado en esta tesis, se utilizó la glicoproteína fusogénica del paramyxvirus SV5 en el cual se pudo observar su expresión por medio de la inmunodetección y microscopia de fluorescencia. Los resultados que tenemos acerca de la liberación del LDH cerca de las 24 horas nos dan indicio de un

aproximado de 50% de citotoxicidad, el cual comparado con la expresión de GALV.fus es ligeramente menor, además no es el mismo ensayo el realizado ya que por *Zhu y colaboradores en 2014* se realizaron un conteo de las células y no liberación de la enzima LDH, la cual empieza a degradarse luego de 9 horas por lo cual puede afectar el porcentaje de citotoxicidad.

Capítulo V

CONCLUSIONES

- Se logró propagar el vector plasmídico pACC-F en *E. coli* HB101
- Se logró transfectar de manera eficiente las células BpRc1 CRL-2217™ de ATCC mediante el uso de lípidos catiónicos.
- El plásmido pACC-F permitió visualizar el proceso de fusión celular en la línea celular BpRc1 CRL-2217 por su capacidad de expresar la proteína fusogénica del paramyxovirus SV5, la cual desencadena la formación de poros en la membrana y la consiguiente formación de sincitios.
- La capacidad de las proteínas fusogénicas víricas para fusionar las células, aunado al conocimiento que dentro de las primeras 36 horas postransfección, ocurre la formación de sincitios; puede ser aprovechable en estudios donde se requiera una permeabilidad celular aumentada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, H. Henderson, B. Zamora, J. Johnston, G. Paramyxovirus Glycoproteins and the Membrane Fusion Process. *Virology* (2016) Springer International Publishing.
2. Bagai, S. and Lamb, R. A. (1995) Individual roles of N-linked oligosaccharide chains in intracellular transport of the paramyxovirus SV5 fusion protein. *Virology* 209:250-256.
3. Corver, J., Ortiz, A., Allison, S.L., Schalich, J., Heinz, F.X., Wilschut, J., (2000). Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology* 269, 37–46.
4. Decker, T., Lohmann-Matthes, M.L., (1988). *Journal of Immunological Methods*. Elsevier. Volumen 115, páginas 61-69.
5. Detu Zhu, Dang Hoang Lam, Yovita Ida Purwanti, Sal Lee Goh, Chunxiao Wu, Jieming Zeng, Weimin Fan and Shu Wang. (2013) Systemic Delivery of Fusogenic Membrane Glycoprotein-expressing Neural Stem Cells to Selectively Kill Tumor Cells. *The American Society of Gene & Cell Therapy*.
6. Dutch, R. E., Joshi, S. B. and Lamb, R. A. (1998) Membrane fusion promoted by increasing surface densities of the paramyxovirus F and HN proteins: Comparison of the fusion reactions mediated by Simian virus 5 F,

- Human parainfluenza virus type 3 F, and Influenza virus HA. *J. Virol.* 72:7745-7753.
7. Earp, L. J., Delos, S. E., Park, H. E. y White, J. M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Inmunol*, 285: 25-66. (2005)
 8. Freeman, S. M., Abbod, C. N., Whartenby, K. A., Peckman, C. H., Koeplin, D. S., Moolten, F. L., and Abraham, G. N. (1993).The. "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.*, 53: 5274–5283.
 9. Gómez-Treviño, A., Castel, S., López-Iglesias, C., Cortadellas., N., Comas-Riu, J. and Mercadé, M. (2003). Effects of adenovirus-mediated SV5 fusogenic glycoprotein expression on tumour cells. *The Journal of Gene Medicine.* 5 (6) 483-492.
 10. Gómez- Treviño, A., Mercade E., Estudio de la glicoproteína fusogénica (F) del paramyxovirus SV5 como nueva herramienta para eliminar células tumorales (2005) *Ciencia UANL Vol II, No. 2*
 11. Goverdhana, S., Puntel, M., Xiong, W., Zirger, J.M., Barcia, C., Curtin, J.F., Soffer, E.B., Mondkar, S., King, G.D., Hu, J., Sciascia, S. A., Candolfi, M., Greengold, D. S., Lowensteien, P.R., Castro, M. G. (2005) Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Molecular therapy Vol. 12, No.2*
 12. Guedan, S., Gros, A., Cascallo, M., Vile, R., Mercade, E., Alemany, R., (2008) Syncytia formation affects the yield and cytotoxicity of an adenovirus

- expressing a fusogenic glycoprotein at a late stage of replication. *Gene therapy* 15, 1240-1245
13. Han, X., Gelein, R., Corson, N., Wade-Mercer, P., Jiang, J., (2011). Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology*. Elsevier. Volumen 287, páginas 99-104.
14. Heminway, B. R., Yu, Y., Tanaka, Y., Perrine, K. G., Gustafson, E., Bernstein, J. M. and Galinski, M. S. (1994) Analysis of respiratory syncytial virus F, G and SH proteins in cell fusion. *Virology* 200:801-805.
15. Higuchi, H., Bronk, S., Bateman, A., Harrington, K., Vile, R. G., Gores, G. J. (2000). Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy. *Cancer Research* 60, 6396-6402.
16. Horvath, C. M., Paterson, R. G., Shaughnessy, M. A., Wood, R. M. and Lamb, R. A. (1992) Biological activity of Paramyxovirus SV5 fusion proteins: Factors influencing formation of syncytia. *J. Virol.* 66(7):4564:4569
17. Jones, C., Inman, M., Peng, W., Henderson, G., Doster, A., Peng, G. C., et al. (2005). The herpes simplex virus type 1 locus that encodes the latency associated transcript enhances the frequency of encephalitis in male BALB/c mice. *Journal of virology*, 79, 14465–14469.
18. Mark, A, Kay, Joseph C. Glorioso, and Luigi Naldini. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*. Review (2001)
19. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., *Medical microbiology*, (2009), Elsevier, Spain.

20. Paterson, R. G., Hiebert, S. W. and Lamb, R. A. (1985) Expression at the cell surface of biologically active fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins of the paramyxovirus simian virus 5 from cloned cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7520-7524.
21. Romero, E., Morilla, M. J., Bakas, L. S. (2001). Vectores lipídicos, nuevas estrategias aplicadas a la terapia génica. *MEDICINA (Buenos Aires) 2000;* 61: 205-214
22. Sambrook, J., Russel, D. W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2001
23. Santalla, M., Fesser, E., Asad, AS., Acosta, D, Harnichar, E., Ferrero, PV. (2013) Terapia génica: desde los extractos y las píldoras a las porciones de ADN. *iMedPub Journals.* Vol.9 No.2:3 doi: 10.3823/098.
24. Schatzlein, A. G. (2001). Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress. *Anticancer Drugs* 12: 275 – 304
25. Serrano-Rivero, Y., Hernández-García, A., Fando-Calzada, R. (2012) Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* ISSN: 0253-5688
26. Simpson, G. R., Horvath, A., Annels, N. E., Pencavel, T., Metcalf, S., Seth, R., Peschard, P., Price, T., Coffin, R. S., Mostafid, H., Melcher, H. H., Harrington K. J., and Pandha, H. S., (2012) Combination of a fusogenic glycoprotein, pro-drug activation and oncolytic HSV as an intravesical therapy for superficial bladder cancer. *British Journal of Cancer* 106, 496–507

27. Tan, L., Jia, H., Liu, R., Wu, J., Han, H., Zuo, Y., Yang, S., Huang, W., (2009) Inhibition of NF- κ B in fusogenic membrane glycoprotein causing HL-60 cell death: Implications for acute myeloid leukemia. *Cancer Letters*. Elsevier. Volume 273, pages 114-121.
28. Vile, R. G., Nelson, J. A., Castleden, S., Chong, H., and Hart, I. R. (1999) Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component. *Cancer Res.*, 54: 6228–6234.
29. Zhu, B., Yang, J., Fu, X., Jiang, Y., (2014) Anti-tumor effects of gene therapy with GALV membrane fusion glycoprotein in lung adenocarcinoma. *Cell Biochem Biophys*. Springer Science. 69:577–582
30. Zhu, B., Yang, J., Jiang, Y., Chen, S., Fu, X. *Gene* (2014) Gene therapy of lung adenocarcinoma using Herpes Virus expressing a fusogenic membrane glycoprotein. *Cell Biochem Biophys*. Springer Science. 69:583–587