



Instituto Nacional
de Salud Pública

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

***“EFECTO DEL SILENCIAMIENTO IN VIVO DE LOS ONCOGENES E6 Y E7 DE
HPV16 POR siRNAs EN UN MODELO TUMORAL MURINO HPV16+”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN
ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

PRESENTA

L.F VIOLETA GUADARRAMA PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. OSCAR PERALTA ZARAGOZA

CUERNAVACA, MOR. MÉXICO. MARZO, 2013



Instituto Nacional
de Salud Pública

*Generación de conocimiento
para el desarrollo de políticas de salud*

AGRADECIMIENTO A CUERPOS ACADÉMICOS Y FINANCIAMIENTO.

GRACIAS AL INSP POR PROPORCIONARNOS EL USO DE ÁREAS ADECUADAS PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO, EL CUAL FUE REALIZADO EN LAS INSTALACIONES DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (CISEI) DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA (INSP) EN EL LABORATORIO DE L2PB, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. OSCAR PERALTA ZARAGOZA.

SE AGRADECE EL APOYO TÉCNICO Y DE ASESORAMIENTO EN LA FASE EXPERIMENTAL A LA Q. GENY FIERROS ZARATE, AYUDANTE DE INVESTIGADOR DEL NUESTRO GRUPO DE TRABAJO.

ASÍ MISMO, APRECIO MUCHO LA ASESORÍA OTORGADA POR LOS MIEMBROS DEL COMITÉ ASESOR LOS CUALES ME AYUDARON A MI FORMACIÓN COMO PROFESIONISTA, CUYOS NOMBRES SON:

DIRECTOR DE TESIS: DR. OSCAR PERALTA ZARAGOZA
ASESOR INTERNO: DR. VÍCTOR BERMÚDEZ MORALES
ASESOR EXTERNO: DRA. ANGÉLICA MENESES ACOSTA

ADICIONALMENTE, AGRADEZCO LOS COMENTARIOS ACERTADOS POR PARTE DE LOS MIEMBROS DEL JURADO DESIGNADO PARA EVALUAR ESTE TRABAJO, CUYOS NOMBRES SON:

DR. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ
DR. OSCAR PERALTA ZARAGOZA
DR. MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ ALEMÁN
DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA
DR. CARLOS G. PÉREZ PLASENCIA

ADEMÁS, AGRADEZCO EL APOYO FINANCIERO OTORGADO POR CONACYT MEDIANTE EL SISTEMA DE BECAS DE POSGRADO (CON NÚMERO DE REGISTRO: 376432). DE IGUAL MANERA, AL FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL DEL SSA-IMSS-ISSSTE-CONACYT CONVOCATORIA S0008-2009-1; POR EL FINANCIAMIENTO OTORGADO AL PROYECTO DEL CUAL SE REALIZÓ EL PRESENTE TRABAJO: "IDENTIFICACIÓN DE GENES BLANCO PARA EL MICRORNA MIR21 EN CÉLULAS CERVICALES TUMORALES HUMANAS TRANSFORMADAS CON HPV", CON CLAVE SALUD-2009-01-111892, EL CUAL ESTÁ DADO DE ALTA EN EL SIID.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

La realización de este esfuerzo convertido en realidad, lo debo a la ayuda de muchas personas. Primeramente, le agradezco a Dios por darme vida y fuerza para hacer posible todo lo que yo quiera. Estoy agradecida y bendecida, porque además de dar un avance en mi vida profesional, también lo hice en lo personal al decidir la unión de mi vida con el hombre perfecto que me complementa. Gracias, Jonathan Salazar León por ser siempre mi compañero en todo momento y por hacer que siempre salga lo mejor de mí, te amo.

En lo que respecta al lugar de trabajo, le agradezco al Dr. Oscar Peralta por haberme dado la oportunidad y confianza para llevar a cabo este trabajo. Agradezco muy especialmente a Geny y Alejandro no sólo por la ayuda técnica sino por la amistad que siempre demostraron tanto a mi esposo como a mí. Les doy gracias a mis compañeros de laboratorio y de clases que fueron tantos, que prefiero no nombrarlos por temor a olvidar a alguno, no obstante, les mando todas mis bendiciones por haber sido conmigo tan divertidos confidentes.

Veo claramente a mi familia, que me apoyó incondicionalmente dándome consejos morales y económicos, gracias por su amor, respeto y confianza, los quiero muchísimo Beto, Leticia, Humberto y a mi gran Familia Pérez. Pero sobre todas las cosas, le agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de crecer entre ustedes, pues me han enseñado el valor del amor, la dedicación, el esfuerzo, la responsabilidad, entre otras muchas cosas, gracias sinceramente desde el corazón.

Finalmente, pero no menos importante, a mis amigos eternos, Juanjo y Enrique, por su amor, buenos consejos y momentos de filosofía, no tengo más que decirles: gracias, los quiero.

DEDICATORIA.

Va con todo cariño para toda mi familia y amigos, mis seres queridos, que siempre me han hecho una mejor persona. Va con todo mi amor para mi esposo John, porque el esfuerzo de este trabajo es una de las pocas cosas que tengo para ofrecerle, además de mi amor, comprensión y respeto.

Va con toda mi dedicación y entrega para unas personitas muy especiales, que aunque no se encuentra en esta vida terrenal, nos esperan en la vida eterna... va por ustedes, mi querido primo Martín Pérez Ortega y mis queridas mascotas Muñequita y Lulú... siempre los llevo en mi corazón.

Va para mi Dios que siempre estuvo para darme fuerza, vida y amor.

RESUMEN

ANTECEDENTES: La infección persistente con el virus del papiloma humano (HPV) favorece el desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCU), el cual es el segundo cáncer más frecuente a nivel nacional y mundial. Los HPVs oncogénicos más prevalentes en México y en el mundo, son los genotipos de alto riesgo tipo 16 y tipo 18 (HPV16 y HPV18). La capacidad oncogénica de estos virus se debe a mecanismos moleculares que ayudan al virus a establecer la infección y promover la formación de cáncer, tales como, evasión del sistema inmune, desregulación del ciclo celular del epitelio cervical infectado y promoción de la proliferación celular, entre otros. En este sentido, las oncoproteínas E6 y E7 del HPV, expresadas en las células infectadas, están involucradas directamente en el desarrollo del CaCU. Ambas oncoproteínas propician la pérdida de funciones cruciales para el control del crecimiento celular. De manera tal que la inhibición de su expresión ha resultado ser exitosa para que la célula retome el control de su ciclo celular y muera. Dado que la inhibición selectiva de la expresión de oncoproteínas del HPV mediante el empleo de RNA de interferencia pequeños (siRNAs) en células infectadas, ha demostrado ser eficiente y específica; puede considerarse una estrategia novedosa para el tratamiento de lesiones neoplásicas causadas por HPV y CaCU.

OBJETIVO GENERAL: Analizar el efecto que tiene la administración de los plásmidos psiRNAE6D, psiRNAE7D, generadores de siRNAs específicos para las oncoproteínas E6 y E7, sobre el crecimiento tumoral en un modelo murino con células HPV16+. Así como la generación de construcciones adenovirales conteniendo estos siRNAs.

METODOLOGÍA: Previamente se han generado los plásmidos de expresión de siRNAs, psiRNAE6D y psiRNAE7D, y se ha validado su funcionalidad para silenciar los oncogenes E6 y E7 de HPV16 en un sistema in vitro, respectivamente [Salazar-León, et al., 2011]. Estos plásmidos se amplificaron y purificaron a gran escala mediante un método que garantiza que se encuentren libres de endotoxinas. Simultáneamente, se realizaron construcciones con DNA del adenovirus tipo V de primera generación, ligado a los siRNAs incluidos en los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D, con la finalidad de generar un vector viral para aumentar la transgénesis de los siRNAs. La fase metodológica para la generación de las partículas adenovirales se desarrolló parcialmente; sin embargo, se planea realizarse como perspectiva de la tesis. Posteriormente, para la evaluación del efecto de la administración de los plásmidos purificados, se generó un modelo tumoral en ratones BALB/c normales con haplotipo H-2^d. En estos animales se inoculó subcutáneamente en el dorso, la línea celular BMK-16/myc que es una línea celular de embrión de ratón transformada con el genoma completo del HPV16, además tiene el mismo haplotipo de los animales de estudio. En este modelo se administraron 50µg de los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D; y se analizó su efecto sobre el crecimiento tumoral mediante la determinación del volumen de la masa tumoral en función del tiempo. Finalmente se procesaron los datos mediante un análisis de regresión lineal por el programa GraphPad Prism5 con la finalidad de conocer su significancia estadística y la tendencia de crecimiento.

RESULTADOS: Los plásmidos pSilencer1.0, psiRNAE6D y psiRNAE7D fueron purificados a gran escala. Adicionalmente, se obtuvieron las construcciones del plásmido adenoviral lineal con un cassette de expresión que contiene la secuencia silenciante siRNAE6 para el silenciamiento de E6. El modelo HPV16+ se estableció, obteniendo tumores de 30-40mm³ después de 48 h de inoculación con la línea celular BMK-16/myc. La administración del plásmido vacío, pSilencer1.0, no tuvo efecto en el crecimiento tumoral con respecto al grupo sin tratamiento (P=0.25), lo cual indica que no existe efecto por la administración de DNA foráneo. Se observó un efecto en la velocidad de crecimiento de los tumores inducidos en el modelo tumoral murino con tratamiento de los plásmidos de expresión psiRNAE6D y psiRNAE7D, con respecto a los controles. La administración con el psiRNAE6D no tuvo efecto significativo en el crecimiento tumoral respecto al grupo control tratado con el pSilencer1.0 (P=0.49). No obstante, la administración del plásmido psiRNAE7D, mostró tener un efecto significativo en el crecimiento tumoral (P=0.007). Adicionalmente, se observó que la inyección con la primera administración de psiRNAE7D, disminuye de manera significativa el crecimiento tumoral (P=0.0008) con una velocidad de 41.53 mm³ ± 7.90 (IC95%: 24.97-58.08) diarios comparado con 11.70 mm³ ± 2.17 (IC95%: 7.149-16.25) diarios del grupo control. La segunda administración no cambia la velocidad de crecimiento (P=0.82), pues el grupo tratado tuvo un crecimiento tumoral de 19.82mm³ ± 5.87 (IC95%: 7.13-32.50) diarios, comparado con 26.55mm³ ± 29.53 (IC95%: -37.24-90.35) diarios para el grupo control. La tercera, tiene un efecto significativo al disminuir la masa tumoral en éste grupo respecto al grupo control, sin embargo los resultados no son confiables debido a fallos técnicos o invasión del tumor hacia órganos interno.

CONCLUSIÓN: El tratamiento con el plásmido psiRNAE7D, en el modelo experimental murino HPV16+, disminuyó significativamente el crecimiento tumoral respecto al tratamiento con el plásmido vacío, psiRNAE6D y sin tratamiento. A pesar de que no se generaron las partículas adenovirales para aumentar la transgénesis de los siRNAs, se logró generar la construcción adenoviral recombinante que incluye la secuencia silenciante de la expresión de la oncoproteína E6.

ABSTRACT

BACKGROUND: Persistent infection with human papillomavirus (HPV) promotes the development of cervical cancer (CaCU), which is the second most common cancer nationally and globally. The most prevalent oncogenic HPVs in Mexico and the world are the high-risk genotypes 16 and 18 (HPV16 and HPV18). The tumorigenicity of these viruses is due to molecular mechanisms that help the virus to establish infection and promote the formation of cancer, such as immune evasion, cell cycle deregulation, promotion of cell proliferation, inter others. In this regard, E6 and E7 oncoproteins HPV expressed in infected cells, are directly involved in the development of the CaCU. Both oncoproteins favor the loss of critical functions to cellular growth control. The inhibition of its expression has proved to be successful for the cell to regain control of their cell cycle and die. Since the selective inhibition of expression of HPV oncoproteins by using small interfering RNA (siRNAs) in infected cells, has proven to be efficient and specific, can be considered a novel strategy for the treatment of neoplastic lesions caused by HPV and CaCU.

GENERAL OBJETIVE: To analyze the effect of the administration of plasmids psiRNAE6D, psiRNAE7D, who generate specific siRNAs for E6 and E7 oncoproteins, on growth tumor in a murine model HPV16+. And the generation of adenoviral constructs containing these siRNAs.

METHODOLOGY: Previously were generated siRNAs expression plasmids, psiRNAE6D and psiRNAE7D, its functionality has been validated to silence oncogenes E6 and E7 of HPV16 in an *in vitro* system. [Salazar-Leon, et al., 2011]. These plasmids were amplified and purified on a large scale by endotoxin free method. Simultaneously, were made DNA constructs with the adenovirus DNA type V of the first generation, including siRNAs from psiRNAE6D and psiRNAE7D plasmids, in order to generate a viral vector to increase the transgenesis of siRNAs. The methodology for the production of adenoviral particles has been partially developed, but has planned as perspective. Subsequently, to evaluate the effect of administration of the purified plasmids, we generated a tumor model in normal mouse BALB/c with H-2d haplotype. In these animals was inoculated subcutaneously on the back, BMK-16/myc cell line, which is a cell line of mouse embryo transformed with the complete genome of HPV 16, also has the same haplotype of the study animals. In this model we administered 50µg of plasmids psiRNAE6D and psiRNAE7D, and analyzed their effect on tumor growth by determining the volume of tumor mass versus time. Finally data were processed using a linear regression analysis by GraphPad Prism5 program in order to meet its statistical significance and the growth rate.

RESULTS: The plasmids pSilencer1.0, psiRNAE6D and psiRNAE7D were purified on a large scale. Additionally, plasmid adenoviral constructs has obtained with an expression cassette containing the sequence of siRNAE6 to silence E6. The murine model HPV16+ was established obtaining 30-40 mm³ tumors after 48 h of inoculation with BMK-16/myc cell line. The administration of empty plasmid, pSilencer1.0, had no effect on tumor growth relative to the untreated group (P = 0.25), suggesting that there is no effect by the administration of foreign DNA. Effect was observed in the growth rate of tumors induced, with the treatment of the expression plasmids, psiRNAE6D and psiRNAE7D, respect to controls. The administration of psiRNAE6D had no significant effect on tumor growth relative to pSilencer1.0 plasmid control group (P= 0.49). However, the administration of psiRNAE7D plasmid, showed to have a significant effect on tumor growth (P= 0.007). Additionally, it was observed that injection of the first psiRNAE7D administration, significantly reduces tumor growth (P= 0.0008) with a rate of 41.53 mm³ ± 7.90 (95%CI: 24.97-58.08) compared with 11.70 mm³ ± 2.17 (95%CI: 7.149-16.25) per day in the group treated with control group. The second administration does not change the growth rate (P = 0.82), as the group treated tumor grew 19.82mm³ ± 5.87 (95%CI: 7.13-32.50) per day, compared with 29.53 ± 26.55mm³ (95%CI: -37.24 -90.35) per day for the control group. The third, has a significant effect in reducing tumor in this group than the control group, however the results are not reliable due to technical failures or tumor invasion into internal organs.

CONCLUSION: Treatment with psiRNAE7D plasmid in murine experimental model HPV16+, significantly reduced tumor growth compared to treatment with the empty plasmid, psiRNAE6D and untreated. Although not adenoviral particles were generated to increase the transgenesis of siRNAs, we produced the recombinant adenoviral construct that includes the sequence silenciante of E6 oncoprotein expression.

Índice de contenido.

Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	ix
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico o conceptual.....	2
a. Salud pública y Cáncer Cervicouterino (CaCU).....	2
b. Características moleculares del HPV.....	3
c. Mecanismo de carcinogénesis del HPV.....	5
d. Silenciamiento de la expresión proteica mediante el proceso de RNA de interferencia (iRNA).	9
e. Silenciamiento de E6 y E7 del HPV16 en modelos <i>in vivo</i>	12
3. Hipótesis	16
4. Justificación.....	16
5. Objetivos	17
6. Material y métodos.....	18
6.1 Amplificación y purificación de plásmidos de expresión de siRNAs (psiRNAE6D y psiRNAE7D) para los oncogenes E6 y E7 de HPV16.	18
6.1.1 Bacterias químico-competentes y transformación bacteriana por choque térmico.....	18
6.1.2. Extracción y purificación a gran escala de los plásmidos psiRNAE6D, psiRNAE7D y pSilencer 1.0.	19
6.2 Construcción de plásmidos recombinantes adenovirales con siRNAE6/E7	20
6.2.1 Amplificación del inserto siRNAE6/E7 a partir de psiRNAE6D/E7D.	20
6.2.2 Amplificación y purificación del plásmido de transferencia pShuttle 2.0.....	24
6.2.3 Doble digestión del amplificado siRNAE6/E7 y de pShuttle 2.0.....	24
6.2.4 Ligación de los productos de la doble digestión, siRNAE6/E7 y pShuttle 2.0.....	25
6.2.5 Transformación y selección de las clonas recombinantes en pShuttlesiE6/E7	25
6.2.6 Confirmación de la identidad del pShuttlesiE6 mediante PCR de colonias positivas, secuenciación y digestión enzimática.	25
6.2.7 Amplificación y purificación del plásmido de transferencia recombinante pShuttlesiE6/E7.....	26
6.2.8 Escisión del cassette de expresión que incluye el siRNAE6/E7.	27
6.2.9 Ligación del producto de la digestión del cassette de expresión con siRNAE6D y el plásmido adenoviral lineal, pAdeno-X.....	28
6.2.10 Transformación y selección de las clonas recombinantes en pAd/siE6-E7.....	29
6.2.11 Confirmación de la clona recombinante en pAd/siE6-E7 mediante PCR colony.....	29
6.3 Cultivo de células.....	32
6.4 Modelo tumoral murino.	32
6.4.1 Manejo y Uso de los Animales de Experimentación.....	32
6.4.2 Generación del Modelo Tumoral y administración de los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D.	33

7.	Resultados	34
7.1	Producción a gran escala de los plásmidos de expresión de siRNAs, psiRNAE6D y psiRNAE7D, y del plásmido vacío, pSilencer1.0.	34
7.2	Generación de una construcción recombinante adenoviral que contenga la secuencia silenciante de la expresión de la oncoproteína E6 y E7, siRNAE6 y siRNAE7.	36
7.2.1	Generación de las construcciones pShuttlesiE6/E7	37
7.2.2	Construcción del plásmido adenoviral recombinante con siRNAE6, pAd/siE6.	38
7.3	Establecimiento del modelo experimental tumoral murino HPV16+.	45
7.4	Evaluación del efecto antitumoral por la administración de los plásmidos psiRNAE6D, psiRNAE7D en el modelo tumoral murino HPV16+ mediante el análisis del desarrollo de la biomasa tumoral.	47
7.4.1	Efecto de la administración del plásmido vacío, pSilencer1.0 y sin tratamiento en el crecimiento tumoral HPV16+.	50
7.4.2	Efecto de la administración de plásmidos silenciadores de E6, psiRNAE6D, en el crecimiento tumoral HPV16+.	51
7.4.3	Efecto de la administración de plásmidos silenciadores de E7, psiRNAE7D, en el crecimiento tumoral HPV16+.	52
7.4.4	Efecto de la administración de plásmidos silenciadores de E6, psiRNAE6D, comparativamente la administración de psiRNAE7D, silenciador de E7, en el crecimiento tumoral HPV16+.	53
7.4.5	Efecto en el crecimiento tumoral de la administración de los plásmidos pSilencer1.0 y psiRNAE7D en los días 0, 6 y 12 mediante el análisis de la pendiente.	54
8.	Discusión	58
8.1	Efecto de la administración de los plásmidos que expresan siRNAs para el silenciamiento de las oncoproteínas E6 y E7, psiRNAE6D y psiRNAE7D, en un modelo experimental tumoral murino HPV16+.	56
8.2	Generación del adenovirus recombinante como vehículo para eficientar la transgénesis.	58
9.	Conclusión	60
10.	Perspectivas	61
11.	Consideraciones éticas y de bioseguridad.....	61
12.	Anexo.....	62
13.	Referencias bibliográficas.....	63

Índice de Figuras.

Figura 1. Organización del genoma del virus del papiloma humano.....	3
Figura 2. Modelo estructural de la proteína E6 del HPV-18.....	6
Figura 3. Modelo estructural de la proteína E7 del HPV-16.....	6
Figura 4. Proceso general del mecanismo de RNA de interferencia (iRNA).....	10
Figura 5. Diseño de la secuencia silenciante de la expresión de las oncoproteínas E6 o E7 del HPV16.....	22
Figura 6. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del promotor U6 y el siRNAE6/E7 a partir del psiRNAE6D/E7D.....	23
Figura 7. PCR colony para el monitoreo de las clonas recombinantes del pAd/siE6-E7y del pAd/LacZ.....	31
Figura 8. Monitoreo del proceso de extracción de plásmido a gran escala en un gel al 1% de agarosa.....	34
Figura 9. Plásmidos psiRNAE6D, psiRNAE7D y pSilencer1.0 obtenidos por la amplificación a gran escala.....	35
Figura 10. Panorama general de la metodología para la construcción de partículas adenovirales recombinantes con el sistema Adeno-X™ Expression System 1 de Clontech.....	36
Figura 11. Amplificación de la secuencia silenciante de E6 y E7, siRNAE6 y siRNAE7, a partir de los plásmidos pSiRNAE6D y psiRNAE7D, respectivamente.....	39
Figura 12. Doble digestión simultánea con <i>Apal</i> y <i>KpnI</i> de siRNAE6/E7 y de pShuttle 2.0.....	40
Figura 13. Crecimiento de bacterias transformadas con el producto de ligación del pShuttle2.0 y el siRNAE6/E7.....	41
Figura 14. Amplificación de la región siRNAE6/E7 de las clonas transformadas por la ligación generada pShuttlesiE6/E7, respectivamente.....	42
Figura 15. Confirmación de la construcción pShuttlesiE6 mediante secuenciación y digestión con <i>PI-SceI/I-CeuI</i>	43
Figura 16. Crecimiento y confirmación de las clonas transformadas con el producto de ligación del genoma adenoviral lineal con el cassette de expresión con el siRNAE6.....	44
Figura 17. Construcciones de plásmidos recombinantes con el cassette de expresión que incluye el siRNAE6.....	44
Figura 18. Modelo experimental murino HPV16+.....	46
Figura 19. Efecto de la administración de los plásmidos pSilencer1.0 y psiRNAE7D en la apariencia física de los tumores inducidos HPV16+.....	48
Figura 20. Efecto de la administración de plásmidos silenciadores de E6 y E7 en el crecimiento tumoral HPV16+.....	49
Figura 21. Efecto de la administración del plásmido vacío, pSilencer1.0 y sin tratamiento en el crecimiento tumoral HPV16+.....	50
Figura 22. Efecto de la administración de plásmidos silenciadores de E6, psiRNAE6D y el control, pSilencer1.0 en el crecimiento tumoral HPV16+.....	51
Figura 23. Efecto de la administración de plásmidos silenciadores de E7, psiRNAE7D y el control, pSilencer1.0 en el crecimiento tumoral HPV16+.....	52
Figura 24. Efecto de la administración de plásmidos silenciadores de E6, psiRNAE6D, y de E7, psiRNAE7D en el crecimiento tumoral HPV16+.....	53
Figura 25. Efecto en el crecimiento tumoral de la administración de los plásmidos pSilencer1.0 y psiRNAE7D en los días 0, 6 y 12 mediante el análisis de la pendiente.....	55

Índice de Tablas.

Tabla 1. Función de los productos de los genes expresados del HPV.	4
Tabla 2. Interacción de la oncoproteína E6 con diferentes blancos moleculares en células infectadas con HPV.....	7
Tabla 3. Interacción de la oncoproteína E7 con diferentes blancos moleculares en células infectadas con HPV.....	8
Tabla 4. Silenciamiento de la expresión de los oncogenes de E6 y E7 con HPV con siRNA.....	11
Tabla 5. Doble digestión simultánea con <i>ApaI/KpnI</i> del vector de transferencia pShuttle 2.0 y del amplificado siRNAE6D/E7D.....	24
Tabla 6. Ligación del pShuttle 2.0 con siRNAE6/E7 digeridos con <i>ApaI/KpnI</i>	25
Tabla 7. Doble digestión del plásmido recombinante pShuttlesiE6 con <i>PI-SceII-Ceu I</i>	27
Tabla 8. Ligación del cassette de expresión al DNA del adenovirus (Adeno-XTM DNA)	28
Tabla 9. Digestión de los productos de la reacción de ligación con <i>SwaI</i>	29
Tabla 10. Mezcla de reacción de la PCR colony.....	30

1. **Introducción.**

El virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés *human papilloma virus*), es el agente causal en el desarrollo del cáncer cervicouterino (CaCU). El CaCU es una de las causas más importantes de mortalidad en México y en el mundo ya que produce alrededor de 250 mil muertes por año a nivel mundial, 80% de las cuales ocurre en países en vías de desarrollo. Existen más de 200 tipos de HPVs, los cuales pueden clasificarse de acuerdo a su capacidad para causar cáncer, en virus de bajo y alto riesgo. Particularmente los tipos 16 y 18 de alto riesgo (HPV16 y HPV18) son los virus con mayor prevalencia a nivel mundial causantes de CaCU, siendo el HPV16 el genotipo con mayor prevalencia presente en el 57% de los casos con CaCU [CDC, 2007; WHO, 2010].

Se sugiere que el proceso de carcinogénesis cervical ocurre como consecuencia de la infección, integración del genoma viral en la célula hospedera y, la expresión de las oncoproteínas virales, siendo éstas últimas las que favorecen el proceso de transformación celular, proliferación celular e inhibición de la apoptosis. La suma de todos estos fenómenos genera descontrol del ciclo celular lo cual conlleva a la patología del CaCU. En este sentido, las oncoproteínas E6 y E7 del HPV16 están involucradas en la carcinogénesis pues algunos de sus blancos celulares son las proteínas supresoras de tumores, p53 y pRb, respectivamente. E6 promueve la ubiquitinación de p53 y causa su degradación vía proteasoma, dejando a la célula epitelial sin proteínas que detecten mutaciones en su genoma ni controlen su crecimiento celular. Así también se promueve la activación de la fase de S del ciclo celular, donde se realiza la síntesis del material genético. E7 se une a miembros de la familia de pRb desestabilizándolos y promoviendo la disrupción del complejo que forma con E2F, lo cual resulta en la activación de factores de transcripción requeridos para la progresión del ciclo celular [López-Saavedra y Lizano Soberón, 2006].

Diversos estudios han evidenciado que el silenciamiento de E6 y E7 por medio del uso de RNA de interferencia pequeños (por sus siglas en inglés, small interference RNA, siRNA) provoca la inhibición del efecto de estas oncoproteínas y favorece que la célula retome su control de crecimiento y se induzca su muerte. Por tal motivo, el uso de siRNAs tiene un alto potencial como estrategia terapéutica en contra del CaCU. Actualmente, se ha demostrado la efectividad de los siRNAs para el silenciamiento de la expresión de E6 y E7 en líneas celulares, lo cual conlleva a la muerte selectiva de células infectadas por el HPV16 [Choo, et al., 2000; Yoshinouchi, et al., 2003; Sima, et al., 2008; Yamato, et al., 2008; Niu, et al., 2006; Chang, et al., 2010;]. En este sentido, recientemente el grupo del Dr. Peralta ha diseñado y validado una herramienta novedosa en el campo de la terapia génica que consiste en la transfección de plásmidos que expresan siRNAs específicos para el silenciamiento de E6 y E7, evaluando su funcionalidad en líneas celulares cancerosas cervicales humanas HPV16 positivo (HPV16+). Los resultados fueron contundentes, ya que la expresión de E6 y E7 se vio disminuida, lo cual coincidió con la restauración de la expresión de pRb y p53 y se observó la inducción de la muerte de las células cancerosas por apoptosis y autofagia [Salazar-León et al., 2011]. Sin embargo, es necesario comprobar su efecto funcional en un modelo tumoral experimental murino infectado por HPV16. Por tal motivo, en este proyecto se decidió evaluar la funcionalidad de estos plásmidos de expresión de siRNAs para inducir el silenciamiento de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV16 y por ende inhibir el crecimiento tumoral en un modelo experimental murino HPV16+. Por otra parte, se generó una construcción adenoviral para siRNAs capaces de aumentar la transgénesis y hacer más eficiente el silenciamiento de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV16 en un modelo tumoral experimental murino HPV16+.

2. Marco teórico o conceptual.

a. Salud pública y Cáncer Cervicouterino (CaCU).

En 1976, el investigador alemán Harold zur Hausen fue la primera persona en demostrar la presencia de los genomas del HPV en verrugas genitales y en tejidos de cáncer de cérvix por medio de experimentos de hibridación [Hausen, 1977; López-Saavedra y Lizano Soberón, 2006], demostrando así la etiología del CaCU. En este sentido, la infección por HPV es la más frecuente de las infecciones que se transmiten por vía sexual en muchos países del mundo. A pesar de que más de la mitad de las personas sexualmente activas son infectadas en algún momento de su vida, la mayor parte de ellos pueden sobrellevar la infección, ya sea de manera asintomática o transitoria, y desaparece con el tiempo. Sin embargo, la infección por el HPV puede ocasionar en otras personas la aparición de verrugas y lesiones cervicales que pueden evolucionar en cáncer cervicouterino (CaCU) [CDC, 2007].

El CaCU es el segundo tipo de cáncer más frecuente en México en mujeres de 45 a 54 años de edad, situándonos por arriba de la tasa de mortalidad mundial (9.2 y 8.2 casos por 100,000 habitantes, respectivamente [WHO/ICO, 2010]. El CaCU invasivo se precede por lesiones precursoras, las cuales se caracterizan por alteraciones en la proliferación y diferenciación celular, la estratificación y atipia nuclear. Estas lesiones se clasifican de acuerdo a sus características histológicas como neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC I, II, III) o de acuerdo a características citológicas como lesiones escamosas intraepiteliales de acuerdo a la terminología de Bethesda [Boulet et al., 2008]. En México se están implementando diversas estrategias para prevenir el CaCU. Se ha demostrado que se puede reducir su incidencia y mortalidad mediante programas de monitoreo o screening de buena calidad citológica y de análisis, con la finalidad de detectar oportunamente lesiones intraepiteliales con potencial evolución a cáncer. Además, con la introducción de las vacunas contra el HPV, cervarix y gardasil, se espera que la tasa de incidencia y mortalidad del cáncer cervical disminuya significativamente en las próximas décadas [Instituto Nacional de Cáncer, 2011]. Los factores que incrementan el riesgo para la infección con HPV son diversos, tales como la promiscuidad, actividad sexual a temprana edad, tener historial de otro tipo de enfermedades de transmisión sexual, presencia de verrugas genitales, Papanicolaou con resultados anormales, pareja sexual con cáncer de cérvix o de pene, edad, persistencia viral, uso prolongado de anticonceptivos orales, coinfección con otros virus como el herpes simple tipo 2, el citomegalovirus humano tipo 6 y 7; así como la carga viral y predisposición genética [López-Saavedra y Lizano Soberón, 2006; WHO/ICO, 2010]. Por otra parte, diversos comportamientos humanos como el uso del condón y la circuncisión, cuya prevalencia en México fueron de 6.4% y <20%, para el 2006 y 2007, respectivamente; tienen un efecto protector significativo contra la transmisión del HPV, lo cual significa una estrategia alternativa preventiva en materia de salud [WHO, 2010]. Sin embargo, no existe una terapia específica en contra del CaCU, por lo que entender la biología molecular de su agente causal será fundamental para el desarrollo de posibles terapias novedosas.

b. Características moleculares del HPV.

De acuerdo al Consejo Internacional para la Taxonomía de los Virus, (ICTV), el virus del papiloma pertenece a la familia *Papillomaviridae*, y los de alto riesgo al género *Alphapapillomavirus* [ICTV, 2010]. El HPV es un virus icosaédrico pequeño de 55 a 60 nm de diámetro formado por ADN de doble cadena con un tamaño de 7,900 pares de bases. La cápside viral de los HPVs está formada por 72 capsómeros, de los cuales 60 son hexámeros y 12 pentámeros. Las proteínas que lo constituyen en mayor proporción es la L1 y en menor la L2. El HPV es relativamente estable y debido a que no tiene una envoltura, permanece infeccioso en un ambiente húmedo por meses [López-Saavedra y Lizano Soberón, 2006; Sanclemente y Gill, 2002].

El genoma del HPV está conformado por tres regiones (Figura 1), una región larga de control (LCR) la cual no contiene marcos de lectura pero si promotores de genes de este virus; una región temprana que codifica para proteínas elementales para la replicación viral, y finalmente, una región tardía codificante para las proteínas de la cápside, L1 y L2. [Sanclemente y Gill, 2002; Horvath et al., 2010]. En la tabla 1 se hace una breve descripción de la función de los marcos de lectura abiertos del HPV.

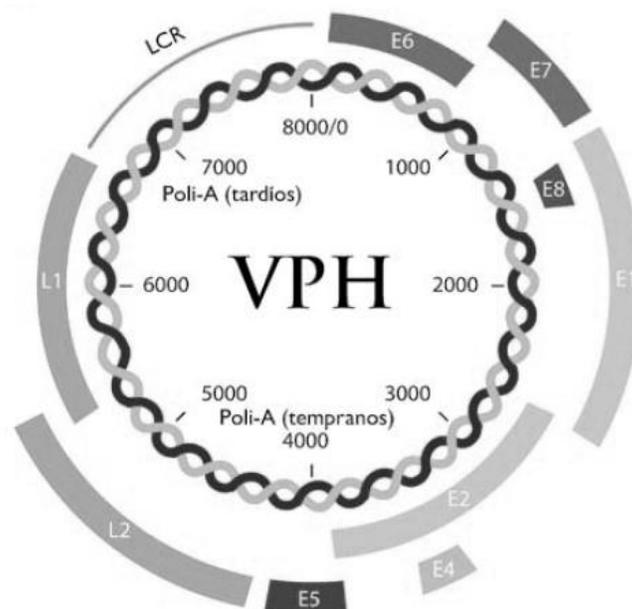


Figura 1. Organización del genoma del virus del papiloma humano. [Modificado de López-Saavedra y Lizano Soberón, 2006].

Tabla 1. Función de los productos de los genes expresados del HPV [Modificada de Sanclemente y Gill, 2002].

Genes	Función
E1	Actividad de DNA helicasa, unión al DNA dependiente de ATP, ATPasa. Involucrada en replicación y represión.
E2	Regulador de la transcripción y replicación viral, control de la expresión genética de la región temprana viral. Necesaria para la eficiente replicación del DNA viral junto con E1.
E4	Expresada como un gen tardío en epitelio diferenciado, y está involucrada en una infección productiva asociada a la queratina del citoesqueleto en células cultivadas epiteliales. Tiene un papel en la liberación del virus.
E5	Actividad transformante en HPV16 <i>in vitro</i> . Estimula la proliferación celular de tipo benigno <i>in vivo</i> pero puede tener un papel en la iniciación de la carcinogénesis.
E6	Papel en el proceso de transformación junto con E7. Tiene propiedades de activación transcripcional. Induce degradación de p53.
E7	Propiedades transcripcionales similares al promotor de adenovirus E2, induce la síntesis de DNA en células quiescentes. Papel en la transformación celular en roedores en cooperación con el oncogén de ras activado. E7 se une a la forma hipofosforilada de la proteína de retinoblastoma (pRb) resultando en su inactivación y permitiendo la progresión celular a la fase S del ciclo celular.
L1	Componente mayoritario de la cápside viral proteica.
L2	Componente minoritario de la cápside viral proteica.

c. Mecanismo de carcinogénesis del HPV.

El 90% de las personas presentan la infección con HPV de manera asintomática, la cual es eliminada en un lapso de 1 o 2 años. Sin embargo, el HPV genital es considerado la causa de las enfermedades de transmisión sexual más común, lo cual constituye alrededor de 500, 000 casos nuevos a nivel mundial de cáncer de cérvix, ano, vulva, pene, de cabeza y cuello [WHO, 2010; Martin D, 2009]. En este sentido, se han establecido programas de tamizaje como la prueba de Papanicolaou (PAP), la cual provee información importante acerca de la detección temprana del CaCU.

En general, el desarrollo del CaCU, desde la infección al desarrollo de la neoplasia, se sugiere que se lleva a cabo en un periodo de 12 a 15 años. Durante este tiempo se generan procesos crónicos de inflamación, una interacción multietapa compleja con el sistema inmune del hospedero, así como la combinación de la expresión de dos oncogenes virales E6 y E7; seguido de la integración del ADN viral en el genoma del hospedero y una serie de cambios epigenéticos que ocurren en lesiones de displasias [Martin D, 2009].

En este sentido, los genotipos HPV16 y HPV18 son los virus de alto riesgo con mayor prevalencia en CaCU en el mundo. En México el 56.8% de los casos de CaCU son debidos a la infección con HPV16 y el 10.7% al HPV-18 (WHO, 2010). Se consideran de alto riesgo debido a que algunos de sus productos de expresión, interaccionan con las proteínas supresoras de tumores, las cuales son reguladoras principales del crecimiento celular (Huang et al., 2010). Precisamente las proteínas E6 y E7 del HPV son las responsables de la inactivación de las proteínas p53 y pRb, las cuales son reguladoras principales del crecimiento celular. La pérdida de su función conlleva a una desregulación del ciclo celular que posteriormente dará como resultado el desarrollo de CaCU. Esto sucede como consecuencia de que E6 se une directamente a p53 promoviendo su ubiquitinación y degradación vía proteasoma. El oncogén E6 tiene una secuencia de 450 a 500 pb que codifica la proteína E6 de 150 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18KDa. La proteína E6 contiene dos motivos dedos de zinc altamente conservados, cuya característica es la secuencia consenso Cys-X-X-Cys, la cual es esencial para su función pues es la que interacciona con sus blancos moleculares [Lizano-Soberón et al., 2009]. E6 se asocia con una proteína celular del hospedero, AP, formando el complejo E6-AP con actividad de E3 ubiquitin ligasa. De esta manera, E6 y E6-AP inducen la rápida degradación de p53 mediante ubiquitinación, y posterior degradación vía proteasoma [Lizano-Soberón et al., 2009; Faridi, et al., 2011] (ver Figura 2). La proteína p53 es la más comúnmente mutada, y se propone que está alterada cerca del 50% de los cánceres humanos [Martin D, 2009]. Se ha comprobado que E6 por sí sola tiene un potencial oncogénico débil en algunas líneas celulares, por lo que la capacidad transformante e inmortalizante se potencia con la cooperación de la proteína E7 [López-Saavedra y Lizano Soberón, 2006].

La proteína E7, por su parte, compete por la unión a la proteína de retinoblastoma (pRb) con el factor de transcripción E2F, promoviendo la entrada a la fase S de síntesis del ciclo celular [Lizano-Soberón et al., 2009] (ver Figura 3). Se ha observado que la inactivación de pRb promueve un efecto antiproliferativo mediado por p53, por lo que la estrategia de promover la eliminación de p53 por parte del HPV es eficiente y suficiente para el proceso de carcinogénesis cervical [Martin D, 2009; Ledwaba et al., 2004]. Adicionalmente, E7 se une a complejos de ciclinas, tales como p33-cdk2, cuya función es controlar la

progresión del ciclo celular [Sima, et al., 2008]. Por su parte, las proteínas E7 del HPV-6 y HPV-11 de bajo riesgo se unen de manera menos eficiente a pRb que las proteínas E7 de los HPVs de alto riesgo [Sanclémente y Gill, 2002], por lo que se ha diseñado como estrategia terapéutica el silenciamiento de este oncogén mediante la aplicación de terapia génica.

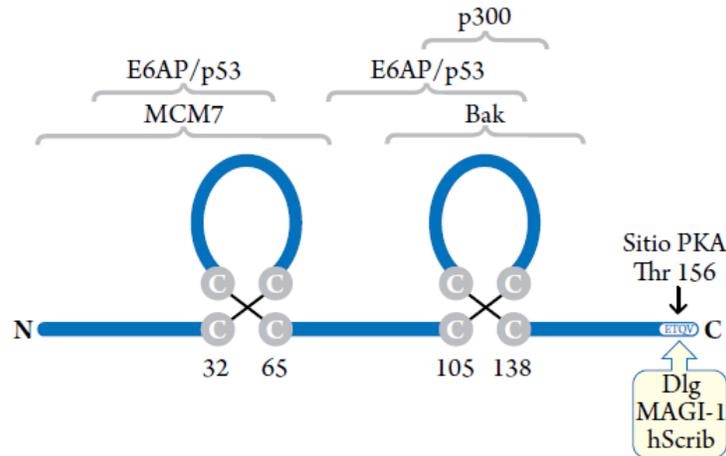


Figura 2. Modelo estructural de la proteína E6 del HPV-18. Se muestran las dos estructuras esenciales en la actividad de E6: sus dos dedos de zinc, como estructuras fundamentales para la interacción de la proteína con varios blancos celulares (Tabla 2), y el carboxilo terminal, el cual contiene el sitio de unión a proteínas con dominios PDZ. [Modificado de Lizano-Soberón et al., 2009].

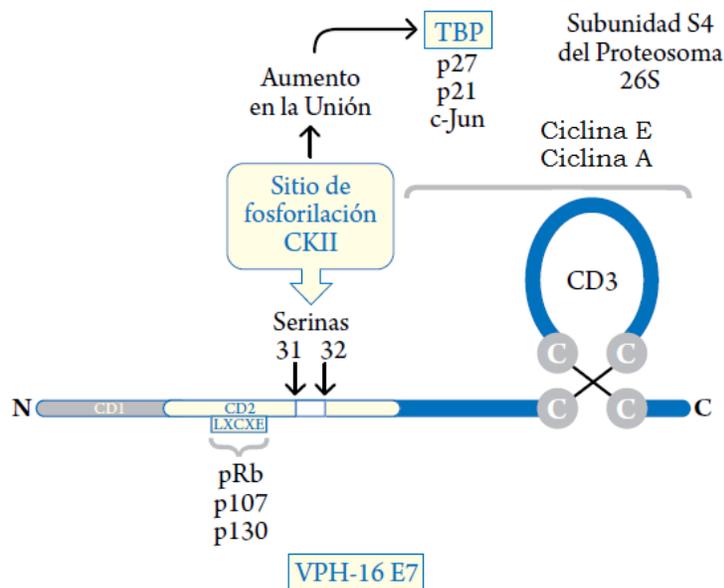


Figura 3. Modelo estructural de la proteína E7 del HPV-16. Se muestran sus tres dominios CD1, CD2 y CD3 altamente conservados, así como sus sitios de interacción con sus blancos celulares que se presentan en la Tabla 3. [Modificado de Lizano-Soberón et al., 2009].

Tabla 2. Interacción de la oncoproteína E6 con diferentes blancos moleculares en células infectadas con HPV.
[Modificada de López-Saavedra y Lizano Soberón, 2006].

Proteínas celulares que interaccionan con E6			
Proteína celular blanco	Función celular de la proteína blanco	Degradación (+/-)	Posibles consecuencias para la célula
AMF-1/Gps2	Incrementa la actividad de P300.	+	Supresión de Gps2. Activación de la transcripción.
Bak	Miembro de la familia Bcl2; proteína proapoptótica.	+	Efecto antiapoptótico.
CBP/P300	Coactivador de p53. Activación de genes de control del ciclo celular, de la diferenciación y de la respuesta inmune.	-	Regulación negativa de la transcripción dependiente de p53.
c-Myc	Factor de transcripción; inducción de apoptosis.	+	Impedir la apoptosis dependiente de c-Myc.
E6AP	Regulación de la transducción de señales en células en proliferación mediante la degradación de la cinasa Blk de la familia Src.	+	Desregulación de estas señales de transducción. Factor esencial para la actividad degradativa de E6.
E6TP1	Proteína activadora de la GTPasa (GAP)-Regulador negativo de Rab.	+	Inhibición de la señal mitogénica mediada por Rab.
ERC55 (E6BP)	Proteína de unión a calcio, participa en la diferenciación de las células epiteliales en la inhibición de la apoptosis.	-	Inhibición de la diferenciación terminal de las células epiteliales. Inhibición de la apoptosis independiente de p53.
hDLG/Sap97	Homólogo humano de la proteína supresora de tumores de los discos largos de Drosophila, importante en la formación de la polaridad en células epiteliales en diferenciación. Formación y mantenimiento de las uniones intercelulares	+	Afecta la adhesión celular, polaridad y proliferación, lo que contribuye a la actividad invasora de las células transformadas.
hScrib	Homólogo humano de la proteína supresora de tumores Scrib de Drosophila, que controla la formación de las uniones intercelulares epiteliales e inhibe el crecimiento celular	+	Pérdida de la adhesión celular y de la polaridad
Factor regulatorio 3 del interferon	Inducción del mRNA del interferón β . Transactivador de los interferones.	-	Respuesta celular inadecuada a la infección viral (no hay interferencia con la replicación viral, ni incremento de MHC-1, ni activación de las células NK).
MAGI- 1/2/3	Proteínas de la unión estrecha; formación de complejo β -catenina. Regulador del supresor de tumores PTEN	+	Afecta la señalización Akt. Inhibición de la apoptosis independiente de P53
Mcm7	Iniciación de la replicación del DNA	+	Omisión del punto de arresto en G1. Posible modulación de la abundancia de Mcm7.
Mupp1	Proteína de andamio con múltiples sitios PDZ. Posible papel en la transducción de señales	+	Rompimiento del ensamblaje de los complejos de señalamiento en las membranas de las células epiteliales.
Paxilina	Proteína de adhesión focal; participa en la adhesión celular y en la regulación del citoesqueleto de actina.	-	Rompimiento del citoesqueleto de actina y de las interacciones de la matriz celular
P53	Proteína supresora de tumores. Regulación de la respuesta celular a los eventos mitogénicos.	+	Pérdida de control del ciclo celular. Efectos antiapoptóticos.
XRCC1	Proteína de reparación del DNA	-	Interferencia con la eficiencia de reparación

Tabla 3. Interacción de la oncoproteína E7 con diferentes blancos moleculares en células infectadas con HPV

[Modificada de López-Saavedra y Lizano Soberón, 2006].

Proteínas celulares que interactúan con E7		
Proteína celular blanco	Función celular de la proteína blanco	Posibles consecuencias para la célula
Miembros de la familia AP1	Factores de transcripción.	Abolición de la actividad de IRF-1.
α-glucosidasa	Enzima del control glucolítico.	Activación alostérica que sobreconsume las reservas de glucógeno. Promoción de hiperproliferación celular.
Ciclina A Ciclina E	Actividad de cinasa.	Activación de ciclina A y E.
Cinasa de la histona H1	Actividad de cinasa.	Interferencia con la transición G2/M del ciclo celular.
hTid-1	Homólogo al supresor de tumores de Drosophila Tid56 dnaj, modulador de la apoptosis.	Activación de los promotores que responden a E2F.
IGFBP-3 (Proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina).	Blanco transcripcional de p53 que limita la disponibilidad del IGF.	Decremento en la cantidad del IGFBP.
IRF-1 Factor transcripcional inducido por el interferón-γ	Regula la expresión del IFN- β .	Inhibición de la activación del promotor del IFN- β mediada por el IRF-1, a través de una deacetilasa de histonas.
Mi2β	Deacetilasa de histonas.	Abolición de la actividad transcripcional de IRF-1.
Mpp2	Factor de transcripción.	Abolición de la actividad transcripcional de IRF-1.
M2 piruvato-cinasa (M2-PK)	Modulación de la actividad de la enzima glucolítica M2.	Cambio del balance desde la forma tetramérica de alta afinidad por su sustrato hacia el estado dimérico de baja afinidad de la M2-PK.
pRB	Regulación del ciclo celular mediante la complejación con los factores de transcripción E2F.	Fosforilación de pRb y subsecuente liberación de E2F, ubiquitinación y subsecuente degradación.
Proteínas pocket asociadas a pRB	Regulación del control del ciclo celular	Pérdida del control del ciclo celular y activación de genes específicos para la progresión del ciclo celular
P21^{CIP-1}	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas	Estimulación del crecimiento mediante la pérdida del control del ciclo celular
P21^{KIP-1}	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas	Estimulación del crecimiento mediante la pérdida del control del ciclo celular
P48	Proteína reguladora del interferón (componente de unión al DNA de ISGF3). Proteína mensajera.	Inhibición de las vías de señalización del interferón por medio de la translocación de P48 a núcleo dada la estimulación del IFN- α .
ATPasa subunidad 4	Subunidad de S4 del proteasoma 26S.	Degradación de pRB mediante la unión directa a la proteasoma.
TAF110 (Factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA)	Involucrada en el inicio de la transcripción; coactivador en la regulación de la transcripción.	Modulación de la transcripción.
TBP (Proteína de unión a la caja TATA)	Involucrada en el inicio de la transcripción.	Interferencia con la activación de los promotores que responden a P53.

d. Silenciamiento de la expresión proteica mediante el proceso de RNA de interferencia (iRNA).

La interferencia post-transcripcional de la expresión proteica específica por medio de la acción de los iRNAs sucede en muchos organismos como un mecanismo de regulación genética endógena y normal. Este mecanismo de silenciamiento de expresión de genes se encuentra altamente conservado en diferentes especies eucariontes. Inicialmente, se describió por primera vez en *C. elegans* al observar el silenciamiento de la expresión de genes homólogos específicos al ser tratado con RNA de doble cadena [Fire, et al., 1998]. En 1990 se describió en plantas al intentar incrementar la expresión de la enzima chalcona sintetasa, que es la encargada de la pigmentación en petunias, lo cual resultó en petunias sin color debido a que la introducción en exceso de ciertos RNAs pequeños redujeron 50 veces la expresión de la enzima [Van der Kol, et al., 1990].

En este sentido, el conocimiento de la acción endógena de los iRNAs ha permitido su aprovechamiento para el silenciamiento específico de diferentes genes con la finalidad de observar su función, así como una potencial herramienta terapéutica en enfermedades relacionadas con la expresión de genes alterados. En el 2001, se demostró que el tratamiento con RNA de doble cadena (double strain RNA, dsRNA) de un tamaño de 21-25 pb (pares de bases), o siRNA (small interference RNA), podía inducir el silenciamiento post-transcripcional específico de varios genes de expresión endógena en diferentes líneas celulares incluyendo HEK293 y células HeLa [Elbashir, et al., 2001]. Además, se observó que las horquillas pequeñas de RNA compuestas por una hebra sentido y antisentido producían el mismo efecto silenciante, estas horquillas tomaron el nombre de shRNA (del inglés "short hairpin RNA") (ver Figura 4). En resumen, se ha observado que el silenciamiento de genes se puede inducir por la administración de siRNAs secuencias específicos, tanto de genes endógenos celulares así como de genes virales exógenos [Aigner, 2007; Correa De Adjounian, et al., 2008]. En esa misma lógica, en el presente trabajo, se propuso evaluar el efecto antitumoral del silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 de HPV16 *in vivo*, mediante el empleo de los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D, HPV16 sobre un modelo tumoral murino HPV16+.

Una vez que los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D se encuentran dentro de la célula, se lleva a cabo la transcripción de los siRNAs resultado de la unión de la secuencia promotora U6 presente en el plásmido y la RNAPol tipo III, encargada de la producción de RNA pequeños [White, 2011]. Esto lleva a la activación de diferentes enzimas que los procesan en pequeños siRNAs de 21-23 pb [Correa De Adjounian, et al., 2008]. Específicamente, se ha observado que esta reacción la cataliza Dicer, una endonucleasa tipo RNAsa III, que es la encargada de procesar los siRNAs [Tijsterman, et al., 2004]. Posteriormente, los siRNAs generados son reconocidos por un complejo de proteínas llamado complejo RISC (por sus siglas en inglés, RNA induced silencing complex). RISC por su parte tiene una actividad helicasa que le hace posible el desenrollamiento de la doble cadena del siRNA, quedándose finalmente sólo con la hebra antisentido o guía de siRNA. De esta manera se permite que la cadena guía o antisentido quede ensamblada en el complejo RISC. Posteriormente, RISC queda activo por lo que reconoce al mRNA que tiene la secuencia complementaria. Si se logra el 100% de complementariedad, el mRNA es totalmente degradado, de lo contrario no se degrada pero la hibridación inespecífica genera una estructura conformacional con el mRNA, lo cual evita su traducción [Doench, et al., 2003]. Esto sucede con la

finalidad de guiar el corte preciso del mRNA en posición complementaria a la cadena guía en el nucleótido 10. Se propone que la secuencia complementaria del mRNA requerida para el silenciamiento no es mayor a 7 nucleótidos de longitud. Diversos grupos de investigación en el mundo han utilizado el silenciamiento de los genes, E6 y E7, con el fin de inhibir el proceso carcinogénico. Básicamente la diferencia entre sus investigaciones está en el diseño de los siRNA para silenciar a los oncogenes E6 y E7, principalmente para las infecciones de HPV16 y HPV-18 de alto riesgo [Peralta-Zaragoza, 2010] (ver Tabla 4).

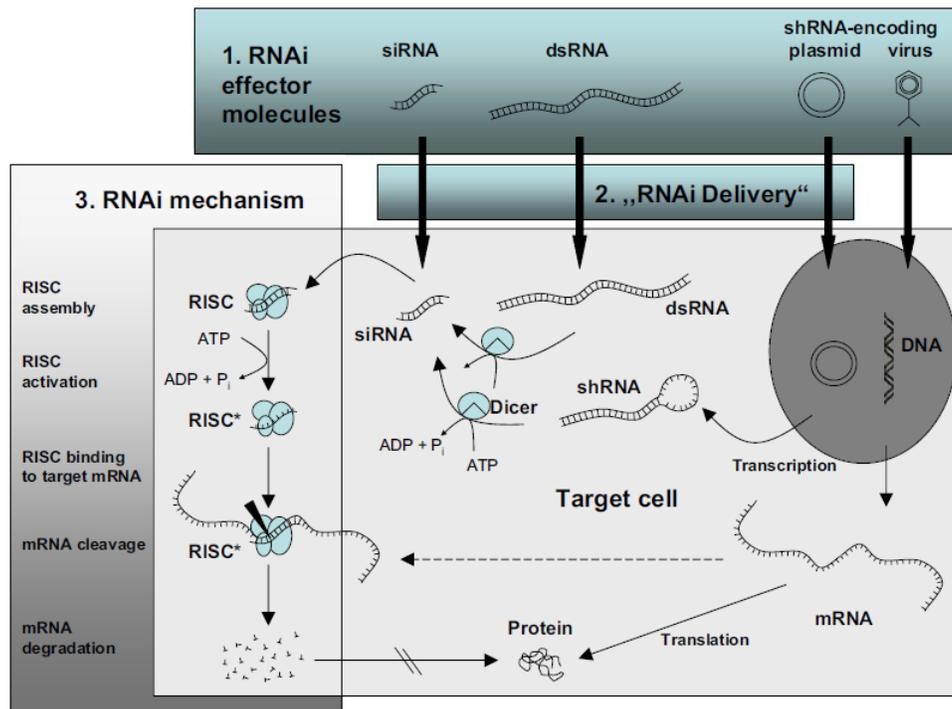


Figura 4. Proceso general del mecanismo de RNA de interferencia (iRNA). El iRNA es un mecanismo intracelular el cual es efectuado por diferentes moléculas efectoras. Una vez que los siRNA son incorporados al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), los siRNA son desnaturalizados quedando en una sola cadena guía. Este ensamble media la hibridación de esta cadena guía acoplada a RISC con el mRNA blanco. Esto resulta en la ruptura del mRNA y su subsecuente degradación. Para que este proceso resulte funcional en un sistema *in vivo* o *in vitro* se requieren estrategias para la liberación de los siRNAs, los cuales se ejemplifican en el cuadro 1 de esta figura y se detallan en la Tabla 4 [Modificado de Aigner, 2007].

Tabla 4. Silenciamiento de la expresión de los oncogenes de E6 y E7 con HPV con siRNAs (Modificado de Peralta-Zaragoza, 2010).

Oncogénesis de HPV	Diseño de siRNA	Efectos biológicos
E6 y E7 de HPV-16	siRNA sintéticos	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-16. Expresión de p53 y p21. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> [Jiang, et al., 2002]
E6 de HPV-16	siRNA sintéticos	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-16. Expresión de p53, p21 y pRb. Inhibición de la proliferación celular <i>in vitro</i> . Inhibición del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> [Yoshinouchi, et al., 2003].
E6 de HPV-18	siRNA sintéticos	Silenciamiento de E6 de HPV-16. Expresión de p53, p21 y pRb. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> [Butz, et al., 2003].
E6 de HPV-16	siRNA sintéticos con liposomas	Silenciamiento de E6 de HPV-16. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> [Niu, et al., 2006]
E6 y E7 de HPV-18	siRNA sintéticos con quimioterapia	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-18. Expresión de p53. Disminución de la citotoxicidad <i>in vitro</i> [Koivusalo, et al., 2005].
E6 de HPV-18	siRNA en lentivirus con quimioterapia	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-18. Expresión de p53. Disminución de la citotoxicidad <i>in vitro</i> [Putral, et al., 2005].
E6 y E7 de HPV-16	siRNA sintéticos en geles bio-adhesivos	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-16. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> . Inhibición del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> [Jiang, 2004].
E6 y E7 de HPV-18	siRNA con atelocolágena	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-18. Expresión de p53 y pRb. Inducción de senescencia celular <i>in vitro</i> . Inhibición del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> [Fujii, et al., 2006].
E6 y E7 de HPV-18	siRNA sintéticos	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-18 y ciclina A. Expresión de p53, pRb, p16, p21, p27. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> [Lea, et al., 2007].
E6 y E7 de HPV-18	siRNA en el plásmido pSUPER	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-18. Expresión de p53 y p21. Análisis de la expresión del transcriptoma de células cancerosas [Kuner, et al., 2007].
E6 y E7 de HPV-16	siRNA en el plásmido psiCheck2	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-16. Expresión de p53 y p21. Inducción de senescencia celular <i>in vitro</i> . Inhibición del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> [Yamato, et al., 2008].
E7 de HPV-16	siRNA en el plásmido pSIRE-DNR	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-16. Expresión de p53, p21 y pRb. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> [Sima, et al., 2008].
E6 y E7 de HPV	siRNA en lentivirus	Silenciamiento de E6 y E7 de HPV-16. Expresión de p53 y p21. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Mayor eficiencia de infección en células en proliferación y en reposo [Gu, et al., 2006]
Gen hTERT	siRNA en pSilencer 4.1-CMVneo	Silenciamiento del gen Htert, disminución de la actividad telomerasa, inhibición de la proliferación celular, inducción de apoptosis de las células tumorales. Inhibición del crecimiento tumoral <i>in vivo</i> [Wang, et al., 2007].

e. Silenciamiento de E6 y E7 del HPV16 en modelos *in vivo*.

A partir de las primeras descripciones del mecanismo endógeno de iRNA, ésta se ha venido utilizando como estrategia para el silenciamiento de genes específicos con la finalidad de mejorar el entendimiento de vías biológicas moleculares que ocurren de forma normal o que suceden en un estado de enfermedad. En este sentido, debido a que las oncoproteínas E6 y E7 están implicadas en la carcinogénesis del HPV para el desarrollo de CaCU, se ha utilizado el sistema de iRNA como técnica para la inhibición de su expresión.

La mayoría de los grupos de investigación implicados en el desarrollo de siRNAs silenciadores de E6 y E7 utilizan programas computacionales que mediante algoritmos establecidos, proporcionan las secuencias silenciadoras con probable éxito. Los criterios para la selección de siRNAs con eficiencia para el silenciamiento de genes blanco básicamente dependen del análisis y selección de las secuencias nucleotídicas del DNA a silenciar, de la longitud del siRNA, pues debe ser menor de 21 a 25 nucleótidos; se prefiere evitar la formación de estructuras secundarias en la secuencia del mRNA que complementará con el siRNA, así como una mínima o nula homología del siRNA con otros genes. Adicionalmente, los siRNAs sintéticos tendrán que ser de doble cadena (dsRNA) para favorecer su acoplamiento con el complejo RISC y el mRNA específico. En cuanto al diseño de vectores basados en siRNAs, se requiere que generen transcritos de siRNAs con un tamaño de 21 a 25 nucleótidos, que la secuencia clonada contenga la secuencia del siRNA separada por una secuencia espaciadora irrelevante, seguida de la misma secuencia del siRNA repetida e invertida. Además, el contenido de G/C debe ser entre el 30% al 60%; la secuencia en el extremo 5' que comience con un residuo de G o C después de un dímero de AA y que al menos contenga las bases: A en la posición 3, T en la posición 10, A en la posición 13, A en la posición 19. Adicionalmente, ésta secuencia debe incluir de cuatro a seis nucleótidos de T en el extremo 3' como señal de terminación de la transcripción para la RNA Pol III [Peralta, et al., 2010; Yoshinari, et al., 2004; Reynolds, et al., 2004; Ui-Tei, et al., 2004].

En el 2002, Jiang et al., validaron por primera vez la funcionalidad de sus propios siRNAs para el silenciamiento selectivo de E6 y E7 del HPV16. En este estudio se demostró que los siRNAs producidos, no interfirieron con la recuperación de las vías regulatorias celulares que estaban inhibidas por la expresión de los genes virales, E6 y E7. Se observó que la inhibición de la expresión de E6 generó el restablecimiento de la expresión de p53, la transactivación del gen inhibidor de ciclinas-cinasas p21-CIP1/WAF1 (evita la fosforilación de pRb y con ello su inactivación como proteína supresora de tumor), así como la disminución de la proliferación celular *in vitro*. Por su parte, el silenciamiento de E7 indujo apoptosis [Jiang, et al., 2002].

Resulta interesante que al analizar a fondo las secuencias silenciadoras que utilizaron Jiang et al., las cuales fueron obtenidas mediante el software Vector NTI [Life Technologies], son exactamente las mismas que se utilizan en la presente tesis (5'-GAGGUAUAUGACUUJGCUUTT-3' para E6, y 5'-AGGAGGAUGAAUAGAUGGTT-3' para E7), las cuales fueron obtenidas mediante el programa de Applied Biosystems-Ambion. Sin embargo, ellos utilizaron siRNAs sintéticos, mientras que nosotros utilizamos la secuencia silenciadora incluida en el plásmido pSilencer1.0, el cual contiene el promotor U6 para la transcripción óptima de siRNAs mediada por la RNA Pol III [Miyagishi y Taira, 2002]. Los resultados funcionales de la transfección con siRNAs sintéticos en células SiHa, que ellos observaron, fueron muy similares a los reportados por nuestro grupo, lo cual fortalece y valida la funcionalidad de las secuencias silenciadoras aquí utilizadas. No obstante, el uso de

siRNAs sintéticos eleva los costos de producción a gran escala, además de ser poco estables en un sistema *in vivo*. Por esta razón, se ha propuesto el desarrollo de vectores que contengan el siRNA de interés [Cheng, et al., 2005].

En otro estudio, se generaron siRNAs silenciadores complementarios al transcrito bicistrónico de E6-E7 [Yoshinouchi, et al., 2003]. En el HPV16, las proteínas E6 y E7 son transcritas por el mismo promotor (P97), produciendo un transcrito bicistrónico, el cual originará mediante splicing alternativo diferentes formas de mRNAs de E6 (E6* I-IV). Resulta importante que E7 es transcrito a partir de los transcritos E6*. El siRNA utilizado en este estudio está dirigido hacia un transcrito río arriba de la región donde se genera el splicing del mRNA de E6, por lo que se sugiere que se logra el silenciamiento simultáneo de E6 y E7 (estos autores sólo muestran la inhibición de expresión de E6). Además de confirmar la funcionalidad de sus siRNAs en células SiHa, evaluaron su efecto *in vivo* mediante la supresión del crecimiento de células SiHa inoculadas subcutáneamente en el dorso de ratones hembra NOD/SCID de seis semanas de edad. En este modelo se usaron 2×10^7 células SiHa previamente transfectadas con 20uM de siRNAs, las cuales se inocularon en ratones inmunodeficientes de la cepa NOD/SCID. Se realizaron medidas tridimensionales del tumor mediante un caliper hasta 45 días, debido a que en este lapso de tiempo no se formaba en el grupo tratado con el siRNA silenciador de E6 un tumor palpable, realizaron otro experimento con una duración de 10 semanas. Se concluyó que las células SiHa tratadas con los siRNAs para E6, en los ratones NOD/SCID, formaron tumores significativamente menores que las tratadas con el control [Yoshinouchi 2003].

De igual manera, en otro estudio se utilizaron siRNAs sintéticos cuyas secuencias fueron obtenidas mediante el programa BLAST para la determinación del mejor siRNA dirigido para el gen E6 del HPV16. Los siRNAs resultantes fueron evaluados *in vitro* e *in vivo* [Niu, et al., 2006]. El modelo *in vivo* resulta muy interesante, pues se evaluó la administración de 2 ug de siRNA de forma intraperitoneal e intratumoral en diferentes grupos de ratones hembra desnudos de 4-6 semanas de edad. Para generar el modelo tumoral, primero se inocularon 5×10^6 células CaSki vía subcutánea en el tejido de la pata delantera del ratón. Cuatro semanas después, la masa tumoral que había crecido hasta 2,121 mm³ de diámetro, fue extraída y cortada en piezas de 2 mm de diámetro. Después, cada pieza fue transplantada en el tejido subcutáneo de otro ratón desnudo en la pata delantera derecha. Dos semanas después, los tumores alcanzaron un tamaño de 130-150 mm³ de diámetro (calculado con la fórmula: $V = \pi/6 \times \text{diámetro mayor} \times \text{diámetro menor}^2$), seguido de esto se formaron cinco grupos de experimentación que fueron tratados de la siguiente manera (n=4): como grupo control se utilizaron dos ratones a los cuales se les inyectó 2 ug de siRNA control disuelto en un agente de transfección en la cavidad peritoneal, y a otros dos ratones se les inyectó vía subcutánea en el tumor. Al grupo 1 se le trató con 2 ug de siRNA para E6 y el agente de transfección vía peritoneal y al día 5 se extrajo el tumor para su análisis. Al grupo 2 se le trató con 2 ug de siRNA para E6 y el agente de transfección vía peritoneal y al día 12 se extrajo el tumor para su análisis. Al grupo 3 se le trató con 2 ug de siRNA para E6 y el agente de transfección vía subcutánea en el tumor y al día 5 se extrajo el tumor para su análisis. Finalmente, al grupo 4 se le administró dos veces con el siRNA para E6, con intervalo de cinco días entre las administraciones, después de siete días tras la segunda inyección, el tumor fue extraído para su análisis. A los tumores extraídos se les realizaron análisis inmunohistoquímicos para observar la presencia de E6 del HPV16 y tinción con la

técnica de TUNEL para observar apoptosis celular. Los grupos tratados con los siRNAs para E6 mostraron un efecto dramático de inhibición en el crecimiento tumoral, suprimiendo la expresión de la proteína E6 e induciendo necrosis tumoral y apoptosis comparativamente con el grupo control. La inyección directa al tumor vía subcutánea tuvo resultados similares a los de la inyección en la vía peritoneal. Se observaron mejores resultados con la segunda administración del siRNA para E6 [Niu, et al., 2006].

Se han diseñado diferentes estrategias para aumentar la estabilidad de los siRNAs sintéticos y con ello su efectividad. En este sentido, la colágena tipo I purificada de cabra y tratada con pepsina, la atelocolágena, se ha utilizado como vehículo para administrar los siRNAs para E6 y E7 de HPV18 *in vitro* e *in vivo* [Fujii, et al., 2006]. Los resultados fueron contundentes, pues se demostró que este sistema de siRNAs para E6 y E7 acoplados a la atelocolágena, inhiben el crecimiento de la masa tumoral en un modelo tumoral murino. Dicho modelo consistía en la generación del tumor mediante la inoculación de 2×10^6 de células SKG-II (transformadas con HPV18) en el dorso de ratones hembra atímicos de ocho semanas de edad. Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño de 50 a 60 mm³, se le administraron los siRNAs acoplados con la atelocolágena y se monitoréó el crecimiento hasta 27 días mediante un caliper y la formula $V = (\text{ancho})^2 \times (\text{largo})$, la cual se utilizó en este trabajo [Fujii, et al., 2006].

Finalmente, con la finalidad de aumentar la eficiencia de liberación en un sistema *in vivo*, pocos grupos de investigación han desarrollado vectores moleculares de tipo viral. El uso de los vectores virales proporciona mayor vida media a los siRNAs y mayor estabilidad, lo cual los convierte en vehículos más eficientes para la liberación de plásmidos que transcriban para los siRNAs específicos [Vannucci, et al., 2003]. En este sentido, se han generado y evaluado partículas de lentivirus que liberan horquillas cortas de RNA (shRNA) para el silenciamiento de E6 y E7 de HPV18 (LV-shRNA) tanto *in vitro* como *in vivo*. Particularmente, el modelo *in vivo* consistió en la previa transducción de células HeLa con una dosis baja y otra alta de lentivirus recombinantes, las cuales fueron transplantadas dos días post-infección en el dorso de ratones hembra Rag^{-/-} de 5-6 semanas de edad (n= 5-10 ratones por grupo). El grupo transplantado con las células HeLa infectadas con la dosis baja de LV-shRNA redujo significativamente el peso del tumor, mientras que las infectadas con la dosis alta resultó en la pérdida completa del crecimiento tumoral [Gu, et al., 2006].

Bajo este panorama, en este trabajo se evaluaron los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7 que transcriben siRNAs para el silenciamiento específico de E6 y E7 de HPV16 en un modelo murino HPV16+, dado que previamente se había confirmado su funcionalidad *in vitro* [Salazar-León, et al., 2011]. Las principales ventajas del uso de los vectores basados en siRNAs, como los que se utilizaron en la presente tesis, es que son económicos y fácilmente escalables para su amplia producción, además se aprovecha la maquinaria endógena celular para la transcripción de las horquillas de silenciamiento del gen de interés por la RNA Pol III; dichas horquillas más tarde reclutarán al complejo RISC para la degradación del mRNA o la inhibición de su traducción [Cheng, et al., 2005]. En este proyecto se utilizarán siRNA en lugar de oligos antisentido para el silenciamiento de E6 y E7, lo cual resulta ser más ventajoso ya que son más estables, tienen alto grado de especificidad por los mRNAs, no son inmunogénicos y resisten a las ribonucleasas, por lo que su eficiencia aumenta [Patil et al., 2005].

Por otra parte, dados los antecedentes que sugieren una baja eficiencia del uso de DNA desnudo para los ensayos *in vivo*, en este trabajo además se inicia la generación de construcciones genéticas adenovirales que contienen las secuencias silenciadoras incluidas en los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D.

En los últimos años los adenovirus han sido ampliamente utilizados como vectores virales ya que liberan el genoma previamente manipulado (virus deficientes de replicación no patogénicos [replication defective virus]) dentro de células de mamífero utilizados en Terapia Génica [The Journal of Gene Medicine, en línea]. La razón de su utilidad se debe a que pueden infectar a casi cualquier tipo de célula en el estado en que se encuentre (quiescentes o en división), pues tiene afinidad a una amplia gama de moléculas receptoras como glicosaminoglicanos de sulfato de heparina, ácido siálico; o receptores de superficie celulares como el receptor de virus Coxsackie (CAR), CD80 y CD86 [Zhang y Bergelson, 2005]. Particularmente, los receptores con glicosaminoglicanos de sulfato de heparina son abundantes en células del epitelio cervical, lo cual hace que la administración de los adenovirus recombinantes a producir en este proyecto sea *in situ* donde se encontrarán las células infectadas con HPV-16.

Además, los adenovirus son fáciles de manipular pues se conoce su genoma completo y su biología (Martínez-Flores y Jiménez-Orozco, 2006); se pueden obtener altos títulos virales en su producción [Dormond, et al., 2009], no se integra al genoma celular y tienen alta capacidad de inserción génica de 7 kb hasta 36 Kb, dependiendo del tipo de adenovirus a utilizar. Históricamente, existen tres generaciones de adenovirus utilizados en la terapia génica, la primera, segunda y tercera que se diferencian en la capacidad de clonar diferentes tamaños del transgen [Khalighinejad et al., 2008; Patil et al., 2005; Martínez-Flores y Jiménez-Orozco, 2006; Dormond et al., 2009].

El grupo de Hamada et al., generaron adenovirus que transcribían RNA antisentido del gen bistrónico de E6/E7 y evaluaron su efecto en células SiHa transformadas con HPV-16, mostrando resultados muy contundentes. Las células SiHa infectadas con el adenovirus clonado con el antisentido disminuyeron significativamente su crecimiento celular, y esta inhibición se potenció 5x al administrar simultáneamente con otra partícula adenoviral que expresaba p53. Más aún, en un estudio de tumorigenicidad realizado por el mismo grupo, el tratamiento con el mismo adenovirus clonado con el antisentido de E6/E7 inhibió completamente la formación de tumores comparado con el grupo control [Hamada et al., 1996]. En este sentido, la propuesta de este proyecto es novedosa debido a que no se ha desarrollado un adenovirus recombinante con construcciones de siRNA silenciadoras de E6 y E7, como entidades aisladas, como potencial sistema de liberación para el tratamiento y prevención del CaCU. Ya que se plantea que éstos transcriban siRNA en forma de horquillas, lo cual le proporciona mayor estabilidad además del reclutamiento del complejo RISC, comparado con los RNA antisentido generados por Hamada, et al.

3. Hipótesis.

Los siRNAs silenciadores de la expresión de los oncogenes E6 y E7 del HPV16 transcritos por los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D, así como por partículas adenovirales, inducirán un efecto antitumoral en un modelo experimental tumoral murino HPV16+.

4. Justificación.

El Cáncer cervicouterino (CaCU) es un problema de salud pública en México ya que es el segundo cáncer más frecuente. El agente causal del CaCU es la infección con el virus del papiloma humano (HPV), siendo el más prevalente el HPV16. Así mismo, se conoce que las oncoproteínas expresadas por el HPV en células infectadas, E6 y E7, tienen un papel crítico en la pérdida del control del ciclo celular, luego entonces, en el desarrollo carcinogénico, pues hacen que su ciclo celular no se controle generando un aumento de su proliferación. Por lo tanto, debido a las propiedades de E6 y E7 en el proceso de carcinogénesis, se propone que su silenciamiento en un modelo experimental tumoral murino HPV16+, llevará a una inhibición del crecimiento tumoral.

A partir del 2002, se han realizado varios estudios exitosos en los que el silenciamiento de E6 y E7 es realizado mediante siRNAs, con resultados contundentes pues se observa el restablecimiento de pRb, p53 así como la inducción de muerte de las células cancerosas. Además se han generado diversos modelos *in vivo* en los que principalmente se utilizan ratones inmunodeficientes, lo cual aumenta el costo pues se necesitan condiciones de experimentación estériles. A pesar del conocimiento generado, en México la investigación especialmente en el campo de la terapia génica del CaCU con siRNAs no existe. Además es difícil contar con protocolos e instalaciones para el manejo de ratones inmunosuprimidos. En ese sentido, en estudios previos en nuestro laboratorio se han confirmado que los siRNAs transcritos por los plásmidos, psiRNAE6D y psiRNAE7D, diseñados en base a algoritmos codificados en el software de Applied Biosystems-Ambion, y el mRNA de E6 y E7 publicado en el GenBank (AF402678.1, para E6 y AF402678.1, para E7); mostraron resultados de inhibición significativos al evaluarlos en ensayos *in vitro* [Salazar et al., 2011]. Así mismo, se pudo confirmar que su empleo también provocó el aumento de la expresión de p53 y pRb, así como la inducción de apoptosis y autofagia.

A diferencia de otros grupos de investigación, la aplicación de estos plásmidos es novedosa debido a que contienen el promotor U6 para la transcripción eficiente de siRNAs para E6 y E7, mediante la RNA Pol III dentro de la célula hospedera, lo cual les proporcionará mayor estabilidad y por lo tanto mayor actividad antitumoral. Sin embargo, es necesario confirmar su capacidad anti-tumoral en un modelo *in vivo*, tal como el que se propone en este estudio evaluar. Dicho modelo tiene la bondad de utilizar ratones de la cepa BALB/c (con sistema inmune normal) a los que se les inducirá la formación de un tumor mediante la inoculación de células BMK-16/myc con el mismo haplotipo que los ratones, lo cual permite su manejo de en instalaciones asépticas con menor costo. La información del presente estudio será de gran interés, no sólo para confirmar la capacidad anti-tumoral de los siRNAs contra las oncoproteínas E6 y E7 del HPV16, sino permitirá estandarizar las condiciones experimentales para las posteriores evaluaciones de nuevas moléculas blanco para la terapia del CaCU.

Por otra parte, es necesario generar un vehículo que conduzca el siRNA hasta el núcleo celular con la finalidad de eficientar la transgénesis y aumentar el efecto del silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 de HPV16. Con esa idea en mente, iniciamos aquí la generación de construcciones adenovirales conteniendo la secuencia de los siRNA para las oncoproteínas E6 y E7 con la finalidad de que en ensayos posteriores se concluya la generación de partículas adenovirales que contengan los siRNAs de interés y sean evaluados en el modelo murino descrito en el presente trabajo.

5. Objetivos.

5.1 Objetivo General.

Analizar el efecto que tiene la administración de los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D generadores de siRNAs específicos para las oncoproteínas E6 y E7, sobre el crecimiento tumoral en un modelo murino con células HPV16+. Así como la generación de construcciones adenovirales conteniendo estos siRNAs.

5.2 Objetivos Particulares.

1. Amplificar y purificar a gran escala, los plásmidos de expresión de siRNAs, psiRNAE6D y psiRNAE7D, así como el plásmido vacío, pSilencer1.0.
2. Generar las construcciones adenovirales de expresión de siRNAs específicos para el silenciamiento de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV16.
3. Establecer el modelo experimental tumoral murino HPV16+.
4. Evaluar el efecto de la administración de los plásmidos, psiRNAE6D, psiRNAE7D, así como de partículas adenovirales, sobre el crecimiento tumoral en un modelo tumoral murino HPV16+.

6. Material y métodos.

6.1 Amplificación y purificación de plásmidos de expresión de siRNAs (psiRNAE6D y psiRNAE7D) para los oncogenes E6 y E7 de HPV16.

Los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D fueron generados previamente por nuestro grupo de trabajo, los cuales están formados por insertos de DNA con secuencia formadora de horquillas codificantes de siRNAs específicos para el silenciamiento de los oncogenes E6 y E7 de HPV16, los cuales fueron diseñados con la ayuda del software Applied Biosystems-Ambion [Salazar-León, et al., 2011]. Estos insertos de DNA fueron clonados entre los sitios *Apal* y *EcoRI* del “polilinker” del plásmido de expresión de siRNAs pSilencer1.0-U6 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), el cual contiene el promotor U6 para la RNA pol-III. La integridad de estos plásmidos se corroboró por electroforesis y su identidad, mediante secuenciación.

6.1.1 Bacterias químico-competentes y transformación bacteriana por choque térmico.

Se procesaron bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) para permeabilizar su membrana (bacterias competentes) para su posterior transformación con los plásmidos de interés. Para esto último, se inocularon 100uL de un vial con una suspensión de *E. coli* DH5- α en 5 mL de medio LB (Sección 12, Apéndice) y se incubó durante la noche a 37°C con movimiento oscilatorio de 200 rpm. Este precultivo se transfirió a un matraz con 100 mL de medio LB y se incubó durante 3-4 h a 37°C a 200 rpm, hasta obtener una densidad óptica de 0.5-0.6 a una longitud de onda de 600 nm. A continuación, se concentró el botón celular mediante una centrifugación a 3000 rpm por 10 min a 4°C en tubos de 50 mL. El botón celular se resuspendió en 10 mL de MgCl₂ 0.1M frío y se incubó por 10 min a 4°C. Posteriormente, se concentró el botón celular por centrifugación a 3000 rpm por 10 min a 4°C, y se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 0.1 M seguido de una incubación por 30 min a 4°C. Nuevamente se concentraron las bacterias por centrifugación a 3000 rpm por 10 min a 4°C y se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 0.1 M/15% de glicerol para su almacenamiento a -70°C.

Una vez obtenidas las bacterias competentes, se procedió con la transformación por choque térmico con los plásmidos psiRNAE6D, psiRNAE7D y pSilencer1.0 de forma independiente. Para esto, se descongelaron los plásmidos y las bacterias a 4°C. En tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, se adicionaron 40 uL de agua MQ estéril, 500 ng de plásmido y 200 uL de suspensión de *E. coli* DH5- α competentes. Se homogenizó y se incubó la mezcla durante 30 min a 4°C. Para aplicar el choque térmico con la finalidad de promover la entrada del plásmido de interés al interior de la bacteria, se incubó la suspensión anterior en un baño de agua a 42°C por 90 s. Inmediatamente, terminado este tiempo se incubó por 5 min a 4°C. Se agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó por 1 h a 37°C. Finalmente se concentraron las bacterias centrifugándolas 5 min a 2000 rpm y se plaquearon en cajas con medio LB adicionadas con 200 ug/mL de ampicilina [No Cat. 171254, Calbiochem]. Se incubaron por 24 h a 37°C para obtener el crecimiento de bacterias recombinantes.

6.1.2. Extracción y purificación a gran escala de los plásmidos psiRNAE6D, psiRNAE7D y pSilencer 1.0.

Los plásmidos psiRNAE6D, psiRNAE7D y pSilencer 1.0, se extrajeron y purificaron 1.0 mediante el kit EndoFree® Plasmid Mega Kit [No cat. 12381, Qiagen], el cual tiene la ventaja de eliminar las endotoxinas contenidas como producto del cultivo de bacterias, además permitió obtener hasta 2.5 mg de plásmido. A continuación se describe el procedimiento realizado para tal fin:

1) A partir de un cultivo de las bacterias recombinantes para cada plásmido de interés en una placa con 200 ug/mL de ampicilina, se tomó una colonia y se depositó en un tubo con 5 mL de medio LB con 200 ug/mL de ampicilina, y se incubó por 8 h a 300 rpm a 37°C. Después se agregó el pre-cultivo a 400 mL de medio LB con 200 ug/mL de ampicilina en un matraz de 1 L. Se incubó de 16-18h a 300 rpm a 37°C. La masa celular del cultivo anterior, se cosechó mediante una centrifugación a 6,000 x g durante 15 min a 4°C. Se utilizó la centrifuga Sorvall RT7 con el rotor F14 y 4 frascos de plástico de 250mL estériles. El botón celular sin sobrenadante se resuspendió en 50 mL de Buffer P1. La suspensión se traspasó a un frasco de vidrio de 1 L estéril seguido de la adición de 50 mL de Buffer P2. La mezcla se homogenizó por inversión de 4 - 6 veces, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. El Buffer P1 contiene el agente LyseBlue, el cual es indicador de la eficiencia del proceso de la lisis bacteriana, de manera tal que la solución se tornará azul. Mientras sucedía la incubación, se atornilló el cartucho "QIAfilter Cartridge" en una botella de 45 mm de cuello (frasco de vidrio de 1L estéril) y se conectó a una fuente con vacío. Una vez terminada la incubación se adicionó a la mezcla anterior el Buffer P3 frío y se homogenizó por inversión vigorosamente 4-6 veces hasta que el color desapareció por completo. Después, se agregó el lisado dentro del filtro, QIAfilter Cartridge, y se incubó durante 10 min. Se aplicó el vacío hasta que todo el líquido había sido filtrado. El filtro se lavó con 50 mL del Buffer FWB2, se revolvió generosamente con una espátula estéril el precipitado y se aplicó el vacío.

2) A la solución filtrada se le adicionó 12.5 mL de Buffer ER y se mezcló por inversión 10 veces seguida de una incubación en hielo por 30 min. Durante la incubación, la columna QIAGEN-tip 2500 se equilibró adicionándole 35 mL de Buffer QBT para su lavado y se dejó vaciar por gravedad. Después, la solución anterior se adicionó a la columna QIAGEN-tip permitiendo su flujo por gravedad. Se lavó la columna con 200 mL de Buffer QC y finalmente se eluyó el plásmido contenido en la resina de la columna con 35 mL de Buffer QN. El plásmido eluido se precipitó mediante la adición de 35 mL de isopropanol y se mezcló generosamente. La solución se traspasó a tubos de microcentrífuga de 2 mL estériles y se centrifugó a velocidad máxima por 30 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el botón de DNA se lavó con 250uL de la solución "etanol endotoxin-free water" y se centrifugó nuevamente a velocidad máxima por 10 min a 4°C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente con una micropipeta, y el botón celular se secó con la ayuda un secador [SpeedVac SC100, Savant]. El DNA se resuspendió en PBS estéril y se cuantificó con ayuda de un espectrofotómetro [NanoDrop 100, Thermo Scientific]. Finalmente, se concentró con la ayuda del equipo Vacufuge plus [Eppendorf], de tal manera que, en menos de 20uL estuvieran contenidos 50 ug de DNA plasmídico, para fines de la dosificación en el modelo experimental murino.

6.2 Construcción de plásmidos adenovirales recombinantes con siRNAE6/E7.

Para la generación de las construcciones adenovirales, se utilizó el sistema de generación de adenovirus, Adeno-X™ Expression System 1 de Clontech [No Cat. 631513, Clontech] (Figura 10). Así entonces, la secuencia silenciante, siRNAE6/E7 con el promotor U6, se clonó en un plásmido de transferencia que incluye el sistema llamado pShuttle2.0. Una vez obtenida la construcción recombinante pShuttlesiE6 y pShuttlesiE7, se procedió a escindir un cassette de expresión que incluyó la secuencia de interés y se ligó al plásmido adenoviral lineal. A continuación, se detalla el protocolo seguido para la construcción de plásmidos adenovirales recombinantes con las secuencias silenciantes.

6.2.1 Amplificación y purificación del inserto siRNAE6/E7 a partir de psiRNAE6D/E7D.

Se cuenta con las construcciones de plásmidos de expresión de siRNAs específicos para el silenciamiento de la expresión de E6 y E7 (psiRNAE6D y psiRNAE7D). Estas construcciones se validaron *in vitro* [Salazar-León, et al., 2011]. A partir de ellas, se procedió a amplificar por PCR (Polymerase Chain Reaction) punto final, el inserto genético correspondiente al promotor U6 y el inserto de DNA que expresa los siRNAs para E6 y E7 de HPV16., respectivamente (Figura 5).

Para tal objetivo, se diseñaron oligonucleótidos complementarios a las regiones laterales de la secuencia silenciante mediante el programa interactivo en línea GeneFisher [Schleiermacher & Meyer, 2011]. Éste programa asegura el éxito de la PCR evitando la complementariedad entre los “primers” y la formación de horquillas internas. Así mismo, también proporciona “primers” estables y que sean complementarios en las regiones deseadas, con un tamaño de 19-25 nucleótidos y una temperatura de alineamiento >58°C; así como secuencias con alto contenido de guaninas y citocinas. Los oligonucleótidos generados incluyeron los sitios de restricción *Apal*, en el extremo 5' del oligonucleótido sentido, y *KpnI* en el extremo 3' del oligonucleótido antisentido. Debido a que en el oligonucleótido sentido se encontró un sitio *KpnI*, se sintetizaron oligos degenerados para eliminar el segundo sitio *KpnI* y hacer más eficiente la clonación del inserto (Figura 6).

Se realizó la mezcla de reacción para el PCR utilizando el sistema 2X KAPA2G Robust HotStar Ready Mix [KK5701, Kapa Biosystems] que contiene la DNA polimerasa, los dNTP's (10mM cada uno), 2mM de MgCl₂ y estabilizadores para una polimerización eficiente. Se realizó un gradiente de temperatura para conocer la T_m real para la amplificación. Las condiciones óptimas de amplificación se dieron con el siguiente programa en un termociclador [Thermal Cycler C1000, Biorad]: 95°C 3min, 95°C 30s, T_m: 62°C 1 min, 72°C 1 min, 72°C 10 min y 4°C ∞, por 30 ciclos. Las mezclas de reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1% con una corriente eléctrica de 100 V durante 1 h, y posteriormente se observó el gel en un Transiluminador [High Performance UV Transiluminator, UVP].

Una vez obtenido el amplificado de 626 nucleótidos, se procedió a repetir varias reacciones de PCR y a purificarlo directamente de la reacción debido a que no se encontraron amplificados inespecíficos. La purificación de este amplificado se realizó con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System [A9282, Promega] como se indica enseguida:

Se agregó el mismo volumen de la solución de unión a membrana que el que se tenía de la reacción de PCR (máximo 350 uL). Se colocó una minicolumna SV en un tubo colector, se le colocó la solución anterior y se incubó 1 min a temperatura

ambiente. A continuación se centrifugó a 16,000g por 1 min y se descartó el filtrado. Se lavó la columna con 700uL de solución de lavado para la membrana y se centrifugó por 1 min a 16,000 g descartando el filtrado. Adicionalmente se lavó con 500 uL de solución de lavado para la membrana y se centrifugó a 16,000g por 5min; se descartó el filtrado y se centrifugó a 16,000g por 1 min nuevamente para remover toda la solución de la columna. Finalmente se colocó la columna en un tubo nuevo de microcentrifuga y se agregó 40 uL de agua MQ a la columna para eluir el DNA. Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 16,000g por 1 min. Se etiquetó y almacenó a -20°C para la posterior reacción de digestión.

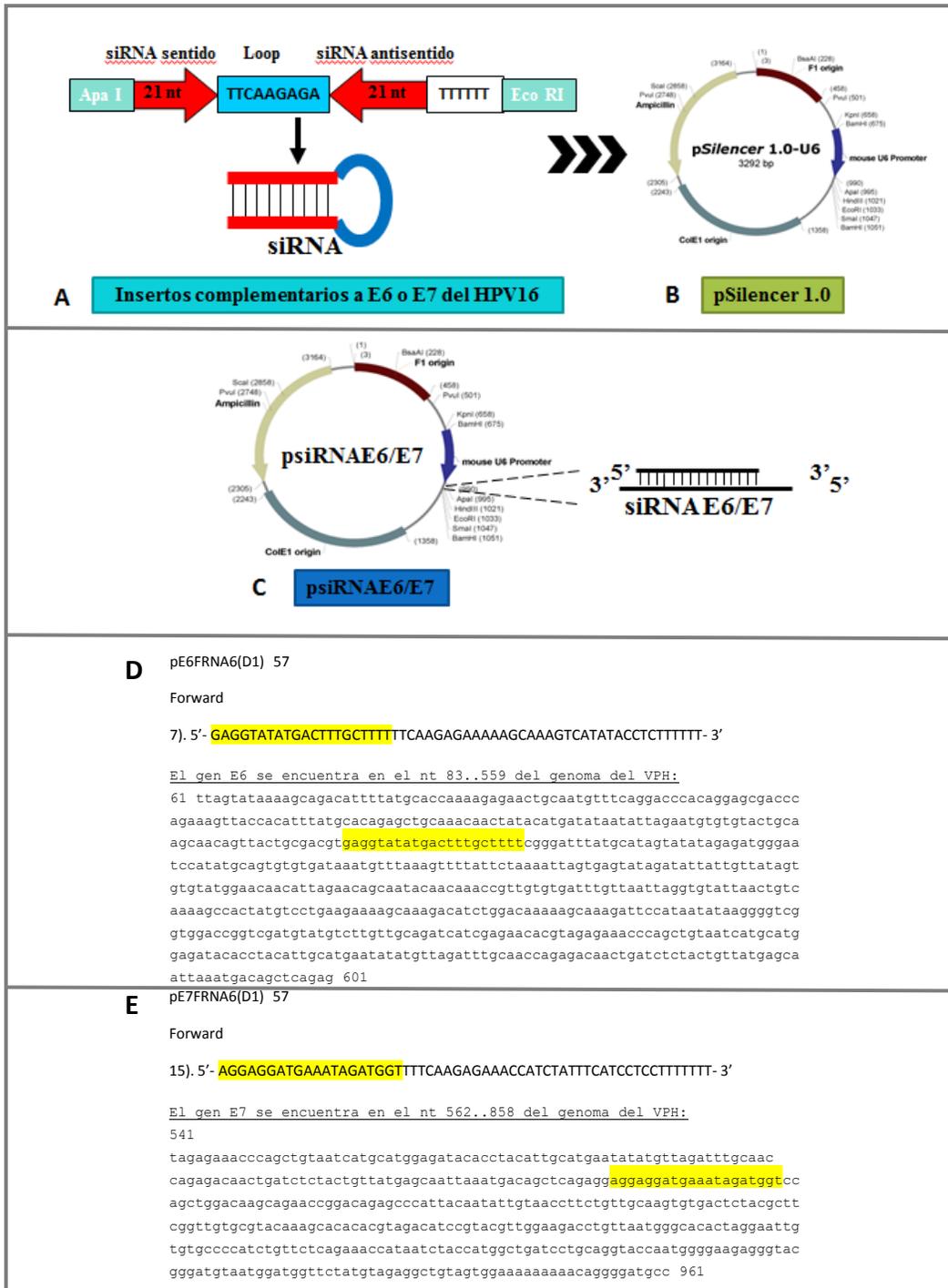


Figura 5. Diseño de la secuencia silenciante de la expresión de las oncoproteínas E6 o E7 del HPV16. Se diseñaron mediante el programa siRNA Target Finder y se validó la especificidad por cada oncoproteína por un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). B. Plásmido de expresión de siRNAs, pSilencer™ 1.0-U6, en el cual se clonó la secuencia silenciante (A) entre los sitios *Apal* y *EcoRI* del "polilinker". C. Plásmido psiRNAE6/E7 resultante de la clonación de A y B de la figura, expresan siRNAs específicos para el silenciamiento de E6 o de E7, respectivamente (se realizaron dos plásmidos para el silenciamiento de cada oncoproteína). D. Secuencia del siRNA silenciante del E6. En amarillo se muestra la secuencia complementaria al RNA mensajero de E6 presente en la posición 224 del gen E6 del genoma del HPV16. E. Secuencia del siRNA silenciante del E7 [GenBank: AF402678.1]. En amarillo se muestra la secuencia complementaria al RNA mensajero de E7 presente en la posición 662 del gen E7 del genoma del HPV16 [GenBank: AF402678.1].

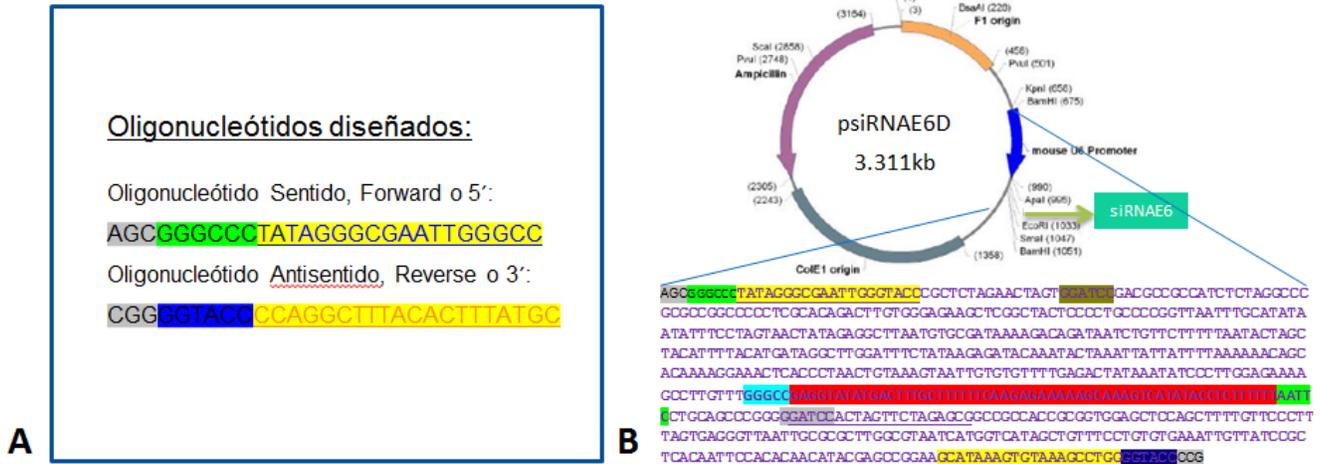


Figura 6. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del promotor U6 y el siRNAE6/E7 a partir del psiRNAE6D/E7D. A. Los oligonucleótidos están constituidos por una secuencia de asentamiento de la enzima de restricción (gris), un sitio de restricción (verde para *ApaI* y azul para *KpnI*), y de 18 y 20 nucleótidos complementarios en la posición de ambos plásmidos psiRNAE6D/E7D en la posición 638 y 1226, respectivamente. En el oligonucleótido sentido se encontró un sitio *KpnI* en su extremo 3', por lo que se sintetizó sin las bases TA encontradas en el centro de la secuencia GGCC. B. Mapa del plásmido psiRNAE6D del cual se amplificará la región siRNAE6. Se muestra la posición de la secuencia que se amplificó.

6.2.2 Amplificación y purificación del plásmido de transferencia pShuttle 2.0.

Una vez purificados los insertos siRNAE6/E7, se generaron bacterias transformadas por el plásmido de transferencia pShuttle 2.0 como se menciona en el punto 7.1.1. Éste plásmido está incluido en el kit Adeno-X™ Expression System 1. Se procedió a purificar el pShuttle 2.0 mediante el proceso por columna PureYield™ Plasmid Midiprep System [A2490, Promega]. Para esto se inocularon 5 ml de medio LB con kanamicina (50 ug/uL) [No Cat.4204-11, Calbiochem] con una colonia de bacterias transformadas almacenadas en glicerol, y se incubó toda la noche a 37°C a una velocidad de 200 rpm. El precultivo se transfirió a un matraz con 200 mL de LB con kanamicina [50 ug/ul] y se incubó bajo las mismas condiciones. Una vez obtenida una densidad óptica >2 OD, se colectó el botón celular por centrifugación a 3000rpm por 10 min a 4°C en una centrifuga con rotor de columpio [Sorvall RT7]. El botón celular seco se resuspendió en 3 mL de solución de resuspensión y se lisó con 3 mL de solución de lisis incubando 3 min a temperatura ambiente. Inmediatamente, se agregaron 5 mL de solución de neutralización y se homogenizó la mezcla. Se centrifugó a 3500rpm por 10 min y la fase acuosa se transfirió a una columna azul con un tubo de 50 mL. Nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones y el filtrado se colocó en una columna blanca con un tubo de 50 mL. Se incubó por 2 min y se centrifugó de igual manera. Se desechó el sobrenadante y se lavó la columna con 5 mL de solución de lavado de endotoxinas. Se centrifugó y se volvió a lavar con 20 mL de solución de lavado de la columna. Se centrifugó dos veces bajo la misma condición. Finalmente, el DNA adherido a la resina de la columna se eluyó con 600uL de agua MQ estéril, se incubó 5 min y se centrifugó. El plásmido obtenido se cuantificó, se analizó en electroforesis de gel de agarosa al 1% y se almacenó a -20°C.

6.2.3 Doble digestión del amplificado siRNAE6/E7 y de pShuttle 2.0.

El amplificado obtenido siRNAE6/E7 contiene en su extremo 5' el sitio de restricción *Apal* y en su extremo 3' el sitio *Kpnl*. Ambos sitios están contenidos en la región del sitio múltiple de clonación del pShuttle 2.0 para que fuera posible la clonación del siRNAE6/E7 en el vector. Se procedió, entonces, a realizar la doble digestión simultánea de ambas enzimas dado que las condiciones óptimas de eficiencia de corte de restricción fueron compatibles. Para esto, los reactivos descritos en la Tabla 5 se mezclaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. A continuación, la mezcla de reacción se homogenizó y se incubó por 4 h a 37°C. Después se incubó 15 min a 65°C para inactivar a las enzimas. Posteriormente, se procedió a la ligación del pShuttle2.0 digerido con el amplificado siRNAE6 y por separado con el siRNAE7 como se describe en la siguiente sección.

Tabla 5. Doble digestión simultánea con *Apal/Kpnl* del vector de transferencia pShuttle 2.0 y del amplificado siRNAE6D/E7D

Reactivos	Digestión de pShuttle2.0	Digestión de siRNAE6D/E7D
Buffer Multicore 10X	2 uL	2 uL
BSA 10 ug/ul	0.2 uL	0.2 uL
pShuttle2.0 (1 ug)	1 uL	--
siRNAE6D/E7D (1ug)	--	1 uL
<i>Apal</i> (10 unidades/uL)	0.5 uL	0.5 uL
<i>Kpnl</i> (10 unidades/uL)	0.5 uL	0.5 uL
H₂O estéril bidestilada	15.8 uL	15.8 uL
Volumen total	20 uL	20 uL

6.2.4 Ligación de los productos de la doble digestión, siRNAE6/E7 y pShuttle 2.0.

La ligación del DNA digerido en la sección anterior se realizó adicionando los reactivos descritos en la Tabla 6 en tubos de microcentrífuga de 500 uL. Se homogenizó la mezcla y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Después se procedió con el protocolo de transformación y selección de clonas recombinante del producto de ligación, los cuales fueron denominados pShuttlesiE6 y pShuttlesiE7 (pShuttlesiE6/E7).

Tabla 6. Ligación del pShuttle 2.0 con siRNAE6/E7 digeridos con <i>Apal/KpnI</i>				
Reactivo	Vector: inserto 1:1	Vector: inserto 1:3	Vector: inserto 1:5	Control negativo
Vector pShuttle 2.0 digerido	300 ng	300 ng	300 ng	300 ng
Inserto siRNAE6D/E7D	47.1 ng	141.3 ng	235.5 ng	--
Buffer de ligasa	2 uL	2 uL	2 uL	2 uL
Ligasa de DNA T4	1 uL	1 uL	1 uL	1 uL
H₂O estéril bidestilada	cbp*	Cbp	cbp	Cbp
Volumen total	20 uL	20 uL	20 uL	20 uL

*cbp: cuanto basta para el volumen total.

6.2.5 Transformación y selección de las clonas recombinantes en pShuttlesiE6/E7.

La transformación se realizó como se detalló en la sección 7.1.1 utilizando como medio de selección, medio LB conteniendo 50 ug/mL de kanamicina. Las bacterias que crecieron fueron re-sembradas y se comprobó que tuvieran el inserto, siRNAE6/E7 mediante un PCR de colonias positivas como a continuación se menciona.

6.2.6 Confirmación de la identidad del pShuttlesiE6 mediante PCR de colonias positivas secuenciación y digestión enzimática.

A continuación, se realizó un PCR de las colonias positivas a partir de la resiembra de cada bacteria transformada con el producto de ligación. Ésta técnica se basa en utilizar como DNA templado, un inóculo bacteriano directamente a la mezcla de reacción del PCR. El aumento de temperatura en la etapa de desnaturalización hace que la bacteria se lise y exponga el plásmido que contiene para ser utilizado como DNA molde o templado. Se realizó la mezcla de reacción para el PCR utilizando el sistema 2X KAPA2G Robust HotStar Ready Mix [KK5701, Kapa Biosystems] que contiene la DNA polimerasa, los dNTP's (10mM cada uno), 2mM de MgCl₂ y estabilizadores para una polimerización eficiente. Las condiciones óptimas de amplificación se dieron con el siguiente programa en un termociclador [Thermal Cycler C1000, Biorad]: 95°C 3min, 95°C 30s, Tm: 60°C 1 min, 72°C 1 min, 72°C 10 min y 4°C ∞, por 30 ciclos. Las mezclas de reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1% con una corriente eléctrica de 100 V durante 1 h, y posteriormente se observó el gel en un Transiluminador [High Performance UV Transiluminator, UVP].

Una vez que se confirmó la clona con el inserto de interés de un amplificado de 626 pb, se procedió a realizar una amplificación del plásmido por miniprep para obtener un poco de plásmido con la pureza necesaria para su secuenciación. El protocolo para su extracción por miniprep se realizó con el kit GeneJet Plasmid Miniprep [K0503, Fermentas] como se indica a continuación.

Se concentró el botón celular mediante una centrifugación a 4000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió con una micropipeta en 250 uL de solución de resuspensión. La suspensión se traspasó a un tubo de microcentrifuga de 2 mL y se agregó 250 uL de solución de lisis, incubándola 5 min a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión y se agregaron 350 uL de solución de neutralización. Se mezcló por inmersión y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a una columna que incluye el kit, *GeneJet Spin Column*. Se centrifugó a 14000 rpm por 1 min y se descartó el fluido. Se lavó la columna con 500 uL de solución de columna y se centrifugó a 14000 rpm por 1 min. Se repitió el lavado y finalmente se centrifugó la columna sin solución. Finalmente, se eluyó el plásmido colectado en la resina de la columna con 50 uL de agua bidestilada estéril y se incubó por 2 min. Para colectar el plásmido, se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. Se cuantificó y almacenó a -20°C.

Una vez obtenida una concentración adecuada del plásmido pShuttlesiE6/E7 se confirmó su identidad mediante una secuenciación con un primer ubicado río arriba del sitio de clonación, en la posición 837 de la secuencia del pShuttle 2.0 cuya secuencia fue AGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCC. Se mandó a secuenciar en la Unidad de Secuenciación del IBT. Posteriormente se escindió el cassette de expresión del pShuttlesiE6D/E7D mediante una doble digestión con las enzimas *I-Ceu I* y *PI-Sce I*. Éste fragmento contiene del extremo 5' al 3': un promotor del CMV, la secuencia de interés (siRNAE6/E7), y una secuencia poli A del SV40. Mediante este corte se pudo apreciar por diferencia de tamaño electroforético, el tamaño del fragmento esperado (1753bp).

6.2.7 Amplificación y purificación del plásmido de transferencia recombinante pShuttlesiE6/E7.

Una vez que se identificó la clona con la construcción de interés, pShuttlesiE6/E7 se amplificó y purificó el plásmido por el kit PureYield™ Plasmid Midiprep System [A2490, Promega]. Para la extracción del plásmido se inocularon 5 ml de medio LB con kanamicina [50 ug/uL] con 20 µL de bacterias transformadas con pShuttlesiE6/E7 o un inóculo de placa. Se incubó toda la noche a 37°C a 200 rpm. Se transfirió el precultivo a 100 ml de medio LB con kanamicina [50 ug/uL] y se incubó por toda la noche a 37°C a 200 rpm. Se cosechó el botón bacteriano por una centrifugación a 3000 rpm por 10 min a 4°C en tubos de 50 mL estériles. Se resuspendió el pellet en 3 mL de solución de resuspensión y se agregó 3 mL de solución de lisis. Se incubó 3 min a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se le agregó 5 mL de solución de neutralización y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 3500 rpm por 15 min a 4°C y el sobrenadante se traspasó a una columna azul con un tubo de 50 mL estéril. Se incubó por 3 min y se centrifugó a 3500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se traspasó a una columna blanca con un tubo de 50 mL y se incubó por 2 min para que el plásmido se quede embebido en la resina blanca. Se lavó la columna con 5 mL de solución de lavado de endotoxinas y se centrifugó por 5 min. Se volvió a lavar la columna con 20 mL de solución de lavado de columna y se centrifugó por 5 min. Nuevamente se centrifugó la columna sin agregarle nada, y se colocó en un tubo nuevo de 50 mL. Se adicionó 600 uL de agua bidestilada estéril para eluir el plásmido y se incubó por 5 min. Finalmente se colectó el plásmido mediante una centrifugación por 5 min a 3500 rpm, se cuantificó y almacenó.

6.2.8 Escisión del cassette de expresión que incluye el siRNAE6/E7.

La escisión del cassette de expresión del pShuttlesiE6D/E7D por una doble digestión con las enzimas I-Ceu I y PI-Sce I. Para esto, se preparó un volumen de reacción de 30 uL en un tubo de microcentrifuga como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Doble digestión del plásmido recombinante pShuttlesiE6 con PI-SceI/I-Ceu I		
Reactivo	Tubo 1 experimental	Tubo 2 control LacZ
Agua estéril	19.5 uL	19.5 uL
Buffer 10X de doble digestión	3.0 uL	3.0 uL
Plásmido pShuttlesiE6/E7 digerido (500ng/uL)	2.0 uL	-
Control Positivo, plásmido pShuttle2-LacZ (500ng/uL)	-	2.0 uL
Enzima de Restricción PI-Sce I (1units/uL)	2.0 uL	2.0 uL
Enzima de Restricción I-Ceu I (5units/uL)	0.5 uL	0.5 uL
10X BSA	3.0 uL	3.0 uL

Las mezclas de reacción se homogenizaron y se incubaron a 37°C por 3 h exactamente. A continuación, la digestión se verificó mediante su corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% con un buffer de carga con SDS (ver Apéndice) para evitar la unión de las enzimas de restricción al DNA. De la demás mezcla de reacción, se extrajeron por lisis alcalina los plásmidos.

Se adicionó 70 uL de Buffer TE (pH 8.0) y 100 uL de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se vortexó y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C para separar las fases. Se separó cuidadosamente la fase superior acuosa y se traspasó a un tubo limpio de microcentrifuga, se descartó la interfase y la fase orgánica. Se adicionaron 400 uL de etanol al 95%, un décimo del volumen total de NaOAc y 1 uL de glicógeno (20 mg/mL). Se vortexó, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C, y se removió y descartó el sobrenadante. Lavar el pellet en 300uL de alcohol al 70% y se centrifugó 14,000 rpm por 2 min a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se secó por centrifugación con el equipo SpeedVac SC100 [Savant] 5 min a temperatura ambiente para evaporar el etanol residual. Se disolvió el DNA en 10 uL de Buffer TE 1X (pH 8.0) y se almacenó a -20°C para la siguiente etapa.

6.2.9 Ligación del producto de la digestión del cassette de expresión con siRNAE6D y el plásmido adenoviral lineal, pAdeno-X.

Para insertar el cassette de expresión proveniente del pShuttlesiE6/E7 y pShuttle/LacZ, se preparó la mezcla de reacción de ligación que se presenta en la Tabla 8. El DNA adenoviral, DNA viral Adeno-X, se ha proporcionado digerido con las enzimas PI-Sce I e I-Ceu I. El producto de ligación que se obtuvo es un plásmido circular con el genoma del adenovirus recombinante sin el gen E1/E3, contiene un sitio de origen de replicación ColE1 y marcador de resistencia de ampicilina para su propagación y selección en *E. coli*.

Tabla 8. Ligación del cassette de expresión al DNA del adenovirus (Adeno-X™ DNA)		
Reactivo	Tubo 1 experimental	Tubo 2 control LacZ
Producto de digestión del pShuttlesiE6/E7 con PI-Sce I/I-Ceu I (de la sección 7.2.8)	2 uL	--
Producto de digestión del pShuttle2-LacZ con PI-Sce I/I-Ceu I (de la sección 7.2.8)	--	2uL
Agua estéril	3 uL	3 uL
Buffer de ligación de DNA 10X	1 uL	1 uL
DNA viral Adeno-X	3 uL	3 uL
Ligasa de DNA (1 unidad/uL)	1 uL	1 uL
Volumen total	10 uL	10 uL

Las mezclas de reacción se homogenizaron, se centrifugaron para concentrarla al fondo del tubo y se incubaron a 16°C toda la noche. A cada tubo se le adicionó 90 uL de Buffer TE (pH 8.0) y 100 uL de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Para separar las fases se vortexó y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C. La fase superior acuosa se separó cuidadosamente y se traspasó a un tubo limpio de microcentrífuga, se descartó la interfase y la fase orgánica. Se adicionaron 400 uL de etanol al 95%, un décimo del volumen total de NaOAc y 1 uL de glicógeno (20mg/mL). Se vortexó, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C, y el sobrenadante se removió y descartó. Posteriormente, el pellet se lavó en 300uL de alcohol al 70% y se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se removió y se secó por centrifugación con el equipo SpeedVac SC100 [Savant] 5 min a temperatura ambiente para evaporar el etanol residual. El DNA se disolvió en 15 uL de agua estéril des-ionizada y se procedió a la siguiente etapa.

Una vez que la reacción de ligación se completó y se purificó como anteriormente se describió, los productos se digirieron con la enzima Swal con la finalidad de linearizar los plásmidos adenovirales no recombinantes (por ejemplo, ligado sin inserto). La digestión con Swal reduce la frecuencia de clonas no recombinantes en la posterior etapa de transformación.

La digestión con Swal se realizó con los componentes de reacción de la Tabla 9. La reacción de digestión de cada tubo se homogenizó y se incubó durante 2 h a 25°C.

Tabla 9. Digestión de los productos de la reacción de ligación con Swal	
Reactivo	Volumen
Producto de ligación de la sección 7.2.9	15 uL
Buffer de digestión 10 X para Swal	2 uL
BSA 10X	2 uL
Enzima de Restricción Swal (10 unidades/uL)	1 uL
Volumen Total	20 uL

Posteriormente, a cada muestra se le adicionaron 80 uL de Buffer TE (pH 8.0) y 100 uL de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Para separar las fases se vortexó y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C. La fase superior acuosa se separó cuidadosamente y se traspasó a un tubo limpio de microcentrifuga, se descartó la interfase y la fase orgánica. Se adicionaron 400 uL de etanol al 95%, un décimo del volumen total de NaOAc y 1 uL de glicógeno (20mg/mL). Se vortexó, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C, y el sobrenadante se removió y descartó. Posteriormente, el pellet se lavó en 300uL de alcohol al 70% y se centrifugó 14,000 rpm por 2 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se removió y el tubo se secó en el equipo SpeedVac SC100 [Savant] 5 min a temperatura ambiente para evaporar el etanol residual. El DNA se disolvió en 10 uL de Buffer TE 1X estéril (pH 8.0) y se almacenó a -20°C para la siguiente etapa.

6.2.10 Transformación y selección de las clonas recombinantes en pAd/siE6-E7

La transformación se realizó como se detalla en la sección 7.1.1, utilizando como plásmido transformante el producto de la digestión con Swal de la sección anterior. Las clonas recombinantes se seleccionaron mediante su cultivo en placas con medio LB con ampicilina (100 ug/mL). Las clonas recombinantes se confirmaron mediante la técnica de la PCR de colonias positivas utilizando el par de oligonucleótidos Adeno-X proveídos en el sistema. El protocolo del PCR de colonias positivas utilizado para la selección de las clonas se describe en la siguiente sección.

6.2.11 Confirmación de la clona recombinante en pAd/siE6-E7 mediante PCR de colonias positivas.

El juego de oligonucleótidos Adeno-X (Adeno-X™ PCR Screening Primer Set) es utilizado para el monitoreo de bacterias transformadas con plásmidos con el DNA adenoviral que contengan el cassette de expresión derivado del pShuttle2. Al usarlos se amplifica una región de 287 pb del segmento del plásmido adenoviral recombinante (Figura 7). Sólo los templados recombinantes generan el amplificado, y las colonias no-recombinantes carecen de la secuencia del plásmido pShuttle2 necesaria para el alineamiento del oligonucleótido antisentido. Para tal fin se realizó el siguiente protocolo:

De las bacterias crecidas en el medio LB con ampicilina provenientes de la transformación con el producto de digestión con *Swa*I, con la ayuda de una punta de micropipeta, se transfirió cada bacteria a un tubo de 200 uL con 20 uL de agua desionizada estéril. De la suspensión se utilizaron 10 uL para el templado del PCR de colonias positivas y los otros 10 uL se inocularon en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 ug/mL) incubándolo durante la noche para la posterior purificación de los plásmidos adenovirales recombinantes. Posteriormente, la mezcla de reacción de PCR de la Tabla 10, se preparó para cada colonia que se analizó.

Tabla 10. Mezcla de reacción de la PCR colony	Volumen
Suspensión de <i>E. coli</i>	10 uL
Agua MQ	24.4 uL
Polimerasa Kapa	12.6 uL
Oligonucleótido Sentido Adeno-X	1 uL
Oligonucleótido Antisentido Adeno-X	1 uL
DMSO	1 uL
Volumen total	50 uL

Además, como control negativo se corrió una muestra utilizando como DNA templado al pShuttle2-LacZ. Las condiciones óptimas de amplificación se dieron con el siguiente programa en un Termociclador [Thermal Cycler C1000, Biorad]: 95°C 2min, 95°C 15s, Tm: 60°C 1 min, 72°C 2 min, 72°C 3 min y 4°C ∞, por 30 ciclos. Las mezclas de reacción se analizaron mediante electroforesis con un gel de agarosa al 1%, con una corriente eléctrica de 100 V durante 1 h, y posteriormente se observó el gel en un Transiluminador [High Performance UV Transiluminator, UVP].

Los cultivos con las clonas recombinantes positivas con el amplificado de 287 pb, se purificaron por lisis alcalina. Primeramente, se prepararon los Buffers 1-4 que se indican en la sección 12 del Anexo. Después, el botón bacteriano se concentró mediante una centrifugación a 14,000 rpm por 30 s y el sobrenadante se descartó cuidadosamente. Enseguida, la suspensión se homogenizó mediante pipeteo en 150 uL del Buffer 1. Después se le adicionaron 150 uL del Buffer 2, se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 150 uL del Buffer 3, mezclándolo por inversión e incubándolo por 5 min a 4°C. Se centrifugó a 14, 000 rpm por 5 min a 4°C y la fase clara se transfirió a un tubo nuevo de microcentrifuga. A continuación, se le adicionaron 450 uL de la solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión. Para separar las fases, se centrifugó por 5 min a 4°C. Después, la fase superior acuosa se separó cuidadosamente y se transfirió a un tubo de 2 mL nuevo, la interfase y la fase orgánica se descartó. Se le adicionó 1 mL de etanol al 95% y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante se removió. El DNA se lavó en 1 mL de alcohol al 70% y se centrifugó por 2 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se removió y el DNA se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco, se disolvió en 30 uL de Buffer 4 y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se vortexeó generosamente y se centrifugó para recuperar el contenido al fondo del tubo. Posteriormente se volvió a confirmar la presencia del plásmido recombinante mediante un PCR con el juego de oligonucleótidos que el sistema Adeno-X provee.

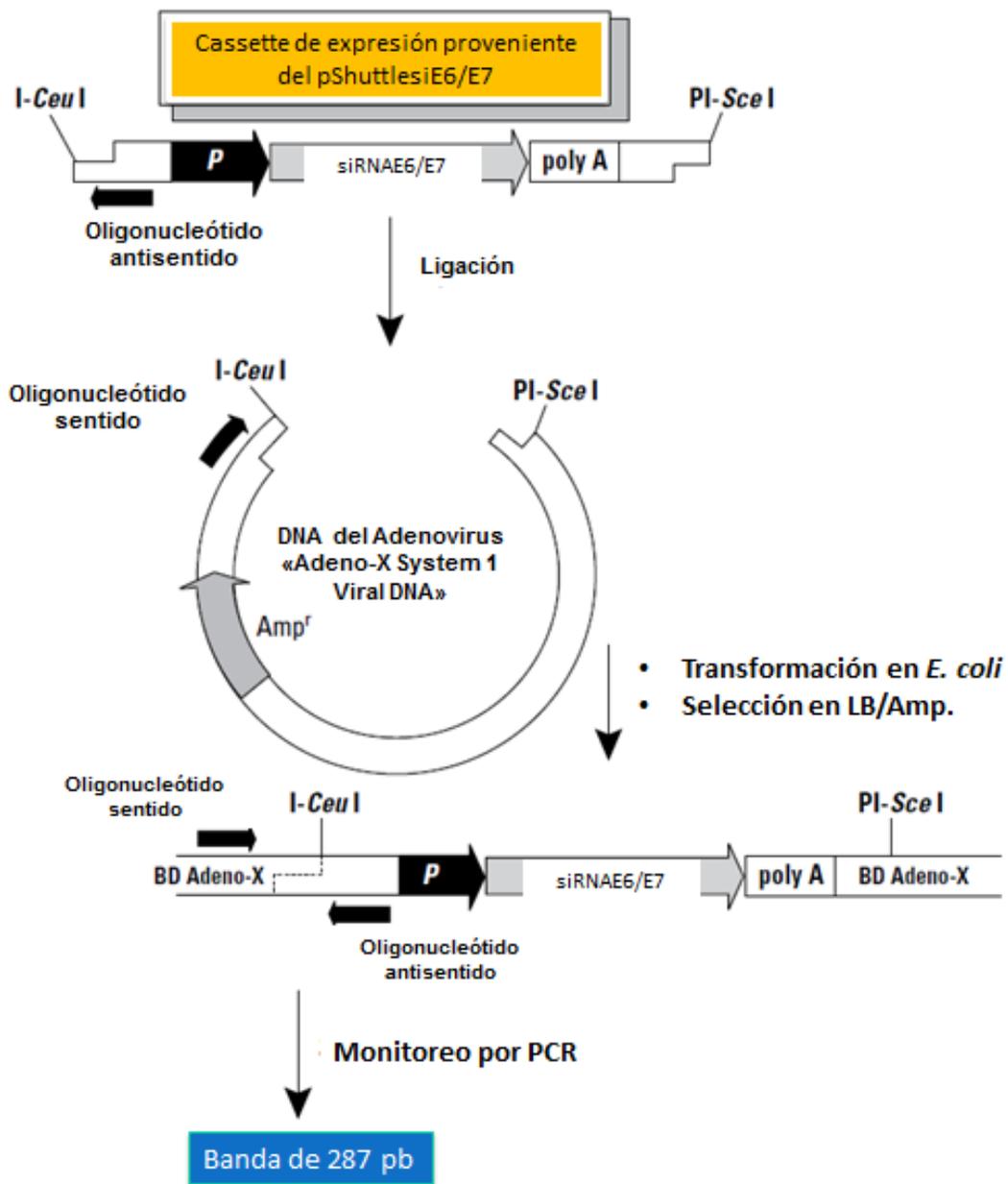


Figura 7. PCR colony para el monitoreo de las clonas recombinantes del pAd/siE6-E7 y del pAd/LacZ.

6.3 Cultivo de células.

Se cultivó la línea celular BMK-16/myc con la cual se indujo el tumor en ratones. Esta línea celular está constituida por células epiteliales de riñón de ratón con haplotipo H-2^d, las cuales están transformadas de manera estable con el genoma del HPV16 escindido en el marco abierto de lectura del gen E2. Por tal motivo, estas células expresan de manera constitutiva los oncogenes E6 y E7, y no la proteína E2 [Hibma, et al., 1994].

La línea celular BMK-16/myc fue utilizada para la inducción de la formación de tumores en el dorso de ratones BALB-c con el mismo haplotipo. Para su expansión se realizó un cultivo con medio DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen] suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino [No Cat. S1650, Biowest], 50 U/ml de Penicilina, 50 ug/ml de Estreptomina [No Cat. 15140, Gibco], 2 mM L-Glutamina [No Cat. G8540-25G, Sigma] y 250 ng/ml de Fungisona [Invitrogen] y se mantuvo a 37°C con una atmosfera del 5% de CO₂. El uso de estas células para el desarrollo tumorigénico como modelo de CaCU ha sido reportado por Hibma et al., en 1994, por Hallez et al., en 1999, así como por Bermúdez-Morales et al., en el 2009.

6.4 Modelo tumoral murino.

6.4.1 Manejo y Uso de los Animales de Experimentación.

El procedimiento para el desarrollo del modelo tumoral murino se realizó de acuerdo con los lineamientos contenidos en el Manual para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Bioterio realizado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales [CICUAE UNAM, 2012]. De igual manera se siguieron las medidas recomendadas en el Reglamento del Bioterio del INSP.

Para el manejo adecuado de los animales de experimentación, el personal involucrado estudió minuciosamente el “Reglamento para la obtención, mantenimiento y empleo de animales de laboratorio en el Bioterio del INPS” así como el “Manual De Organización Y Procedimientos” creado por el “Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales, CICUAE FMVZ-UNAM” [CICUAE UNAM, 2012]. Además todos los procedimientos se realizaron con el asesoramiento de investigadores cuya experiencia es amplia en el ámbito del manejo de animales de laboratorio.

Es importante salvaguardar la seguridad del personal de investigación involucrado, por lo que se tomaron en cuenta medidas de bioseguridad básicas como el uso de guantes dobles y cubrebocas desechables, así como bata y careta, que sólo se utilizaron para el manejo de animales del laboratorio. Se acataron las conductas y medidas de bioseguridad establecidas en el Manual de Procedimientos para el Manejo de Sustancias CRET I Y RPBI del INSP [Perales Ortiz & Gómez Cerón, 2009].

Los ratones se mantuvieron en la Unidad del Bioterio del INSP que se encarga de reproducir y salvaguardar la integridad de los mismos, brindándoles agua potable, alimento diariamente, así como un hábitat limpio y seco.

Con la intención de disminuir el sufrimiento de los animales, antes de inocular las células BMK-16 o con el tratamiento deseado, los ratones se anestesiaron en una cámara con éter con propósitos analgésicos y tranquilizantes. El éter es un solvente anestésico suave que no daña las vías respiratorias de los ratones. Al finalizar el monitoreo del crecimiento tumoral, los animales se sacrificaron mediante la exposición con cloroformo en una cámara especial donde se aseguró su muerte rápida. Los cadáveres de los animales de experimentación fueron manejados de acuerdo a las normas de bioseguridad del manejo de desechos biológicos desechándolos en bolsas de polietileno amarillas y almacenándolas bajo refrigeración a -20°C para su posterior desecho por una empresa encargada del manejo de RPBI [Perales Ortiz & Gómez Cerón, 2009].

6.4.2 Generación del Modelo Tumoral y administración de los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D.

Para generar el modelo tumoral en los animales, se utilizaron ratones BALB/c sanos de seis semanas de edad que expresaban el haplotipo H-2^d. La fuente original del pie de cría de los ratones fue “The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine USA)”. Estando los animales anestesiados, se inocularon subcutáneamente en el dorso, 5×10^5 células BMK-16/myc en 50 uL de PBS. Posteriormente, la eficiencia del crecimiento fue verificada al determinar el volumen del tumor a diferentes tiempos post-inoculación. La masa tumoral se evaluó diariamente mediante su medición directa con un calibrador electrónico a partir de que el tumor fue palpable. El volumen tumoral se obtuvo con el siguiente cálculo:

$$\text{Volumen tumoral} = (\text{diámetro mayor en mm}) \times (\text{diámetro menor en mm})^2$$

Una vez que los ratones tuvieron un volumen tumoral entre 20 y 30 mm³ (2 ó 3 días después de la inoculación) se separaron en lotes experimentales para los ensayos de administración de los plásmidos como a continuación se menciona.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la inhibición de la expresión de los oncogenes E6 y E7 del HPV16, se formaron cuatro grupos de ratones cuyo tratamiento fue la administración con el plásmido psiRNAE6D, con psiRNAE7D, con el plásmido pSilencer1.0 (plásmido vacío) y sin tratamiento (se le administrará solución amortiguadora de fosfatos PBS, ver sección 12, Apéndice), respectivamente. No se realizó la evaluación del efecto de la administración de partículas adenovirales que expresan los siRNAs para E6 y E7 sobre el crecimiento tumoral debido a que no se ha concluido su generación (sección 6.2 de la metodología).

En este sentido, para la aplicación de los siRNAs, se utilizó una concentración de 50 ug de cada plásmido en un volumen final de 20 uL con PBS. Además, con el objetivo de utilizar el mínimo número de animales y obtener un resultado con reproducibilidad biológica se emplearon tres ratones por grupo de experimentación.

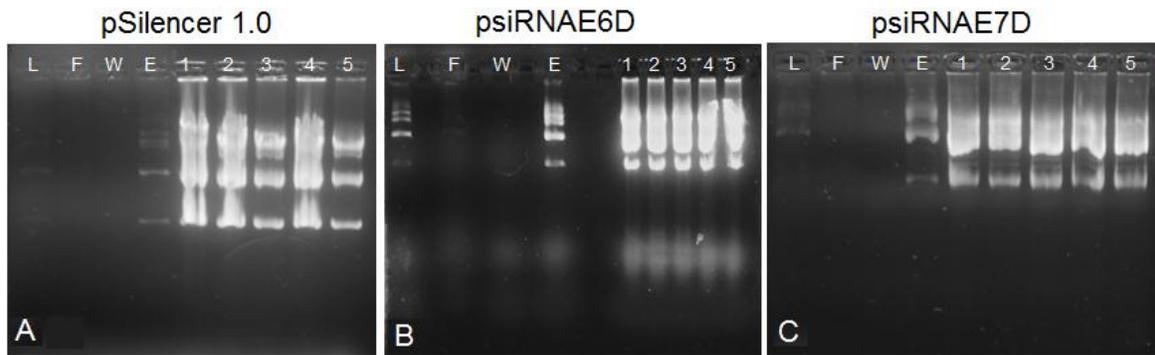
Se asignó como día cero, al día en el que se administró la primera dosis intradérmica cuando el tumor tenía un volumen de 30-40 mm³. Se observó que al día 6 los tumores crecieron ligeramente, por lo que se inyectó una segunda administración de 50 ug de plásmido. Al día 12, se inyectó la tercera administración de tratamiento y se monitoreó el crecimiento tumoral hasta el día 19, día en el que se sacrificaron los ratones de experimentación. Se decidió terminar al día 19 debido a que no había razón por la cual se continuara con el crecimiento del tumor y con esto aumentara el sufrimiento de los animales.

Se determinó el volumen tumoral diariamente y los resultados fueron analizados mediante el programa Graph Pad Prism 5, aplicando un análisis de regresión lineal, con una n de 3 para cada grupo y un intervalo de confianza del 95%. Los resultados se consideraron con diferencia estadísticamente significativa si $P < 0.005$.

7. Resultados.

7.1 Producción a gran escala de los plásmidos de expresión de siRNAs, psiRNAE6D y psiRNAE7D, y del plásmido vacío, pSilencer1.0.

Los plásmidos pSilencer1.0, psiRNAE6D y psiRNAE7D se obtuvieron a gran escala por la técnica de MegaPrep de Qiagen (Sección 7.1.2). Para evaluar la eficacia de la técnica de purificación, se monitoreó el proceso de extracción de plásmido mediante su muestreo en diferentes etapas, con la finalidad de evaluar la eficiencia del procedimiento (Figura 8). En la fase del lisado bacteriano se encontró plásmido íntegro (carriles L), mientras que una vez que el lisado fue filtrado por la columna, no se encontró plásmido (carriles F). Tampoco se encontró plásmido al lavar la columna (carriles W), lo cual indica que el plásmido estuvo adherido eficientemente a la columna utilizada pues una vez que se eluyó con agua estéril se observó plásmido en la solución (carriles E, 1-5).



L: Lisado
F: Filtrado de la columna
W: Filtrado del lavado de la columna
E: Elución de la columna
1-5: Plásmido concentrado en diferentes alícuotas

Figura 8. Monitoreo del proceso de extracción de plásmido a gran escala en un gel al 1% de agarosa. En el panel A, B y C se observan diferentes muestras tomadas durante el proceso de extracción por MegaPep (ver metodología en sección 6.1.2). Se muestreó el lisado (carril L), el filtrado de la columna (carril F), el filtrado de la columna cuando fue lavada (carril W), el fluido eluído de la resina de la columna (carril E), así como diferentes alícuotas obtenidas al precipitar con isopropanol (carriles 1-5) para los plásmidos, psiRNAE6D, psiRNAE7D y pSilencer1.0, respectivamente. L: lisado; F: Filtrado de la columna; W: Filtrado del lavado de la columna; E: Elución de la columna; 1-5: Plásmido concentrado en diferentes alícuotas.

Una vez que se generaron los plásmidos y se cuantificaron, fue necesario concentrarlos para obtener 50 ug de plásmido es un volumen máximo de 20 uL (Figura 9, panel A, B y C). Después de su concentración, se analizó este material en gel de agarosa con la finalidad de conocer su integridad. En la Figura 9, panel D, se observa que los plásmidos fueron purificados correctamente pues no se observa degradación del DNA. Estos resultados indican que los plásmidos purificados son adecuados para su administración en el modelo murino tumoral HPV16+. Cabe mencionar que el paquete EndoFree® Plasmid Mega Kit [No cat. 12381, Qiagen] utilizado, garantiza que el producto obtenido esté libre de endotoxinas para su aplicación *in vivo*.

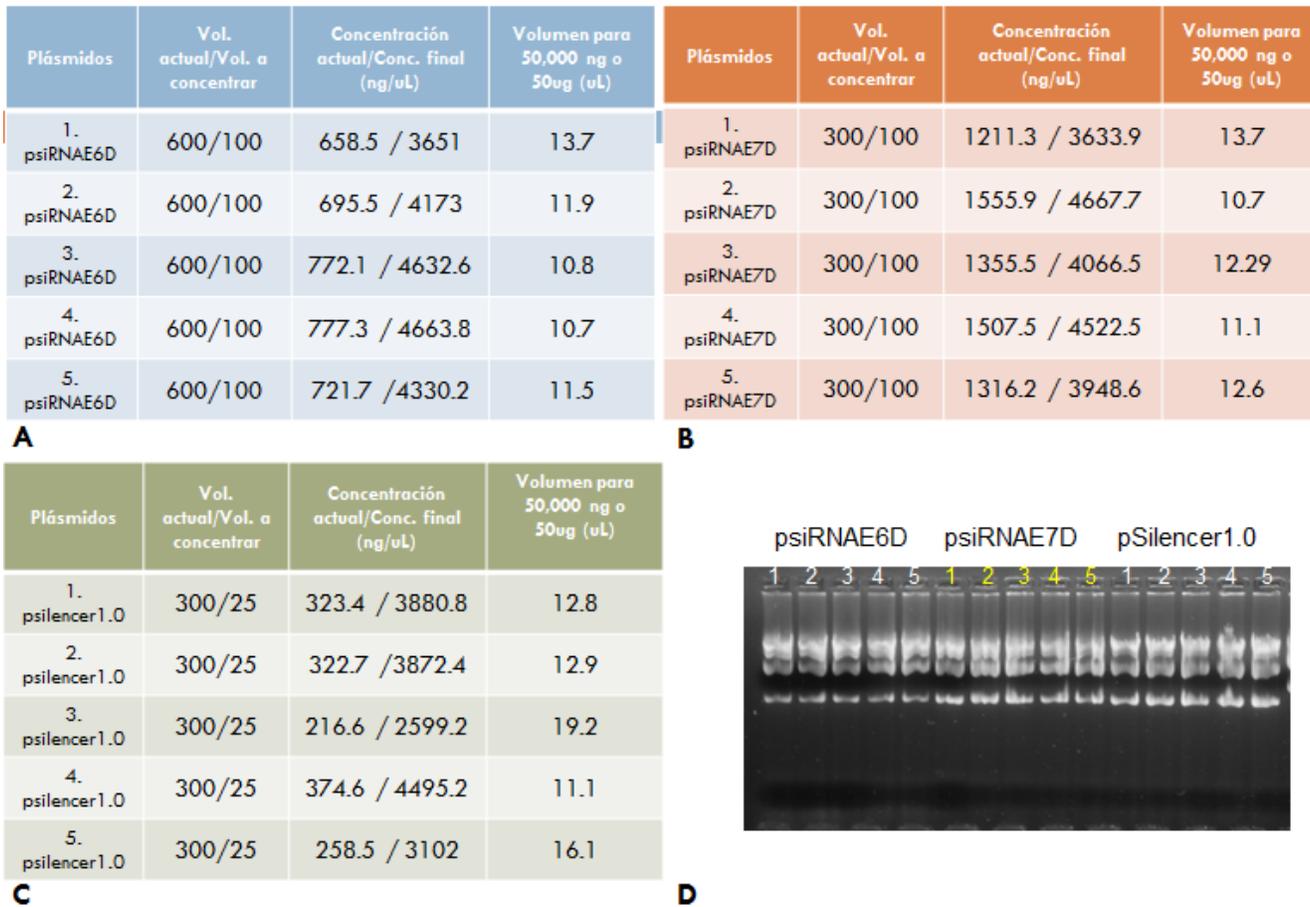


Figura 9. Plásmidos psiRNAE6D, psiRNAE7D y pSilencer1.0 obtenidos por la amplificación a gran escala. Panel A, B y C. Alícuotas obtenidas de la extracción de 400 mL de cultivo de bacterias transformadas con los plásmidos psiRNAE6D, psiRNAE7D y pSilencer1.0, respectivamente. En la cuarta columna de cada panel se muestra el volumen necesario en los que se contienen 50 ug de plásmido, el cual se utilizó llevándolo a un volumen final de 20 uL con PBS estéril. Finalmente esta solución se usó como tratamiento en el respectivo grupo de ratones. D. Gel de agarosa al 1% que muestra la integridad de los plásmidos extraídos.

7.2 Generación de una construcción recombinante adenoviral que contenga la secuencia silenciante de la expresión de la oncoproteína E6 y E7, siRNAE6 y siRNAE7.

Simultáneamente a la purificación de los plásmidos, psiRNAE6D y psiRNAE7D, al establecimiento del modelo tumoral murino y a la evaluación de éstos en el modelo tumoral, se diseñaron adenovirus recombinantes que expresaran los siRNAs silenciantes de E6 y E7 correspondientes. Como se mencionó en la sección 7.2, se utilizó el sistema Adeno-X™ Expression System 1 de Clontech con la finalidad de generar partículas adenovirales recombinantes que contengan la secuencia silenciante, siRNAE6 y siRNAE7, de manera independiente. En la Figura 10 se presenta la metodología general del sistema. En este proyecto se logró avanzar hasta la obtención de la construcción genética con el genoma del adenovirus clonado con el siRNAE6 silenciante de la oncoproteína E6.

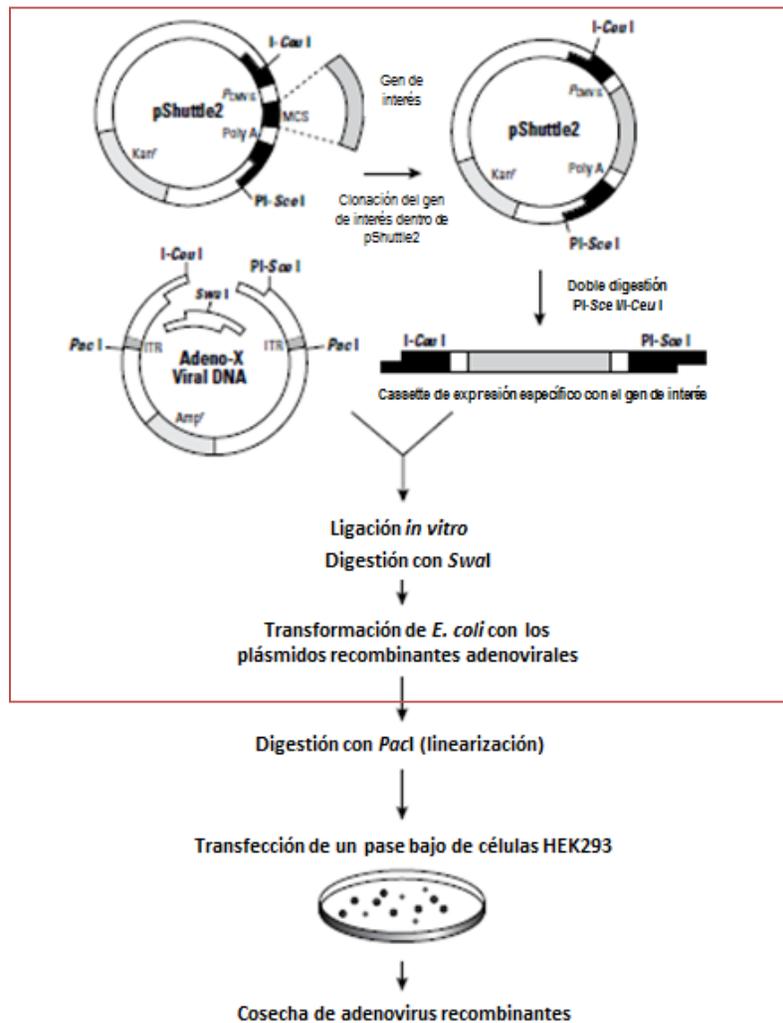


Figura 10. Panorama general de la metodología para la construcción de partículas adenovirales recombinantes con el sistema Adeno-X™ Expression System 1 de Clontech. En esta sección se presentan los resultados obtenidos hasta la generación de la construcción genética del DNA del adenovirus ligado al cassette de expresión con el siRNAE6 (área dentro del cuadro).

7.2.1 Generación de las construcciones pShuttlesiE6/E7.

Como primer paso, el objetivo fue clonar la secuencia silenciante de las oncoproteínas E6 y E7, a partir de los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D, en el vector de transferencia pShuttle2.0 con la finalidad de generar las construcciones pShuttlesiE6 y pShuttlesiE7. Fue necesaria la clonación de la secuencia de interés, siRNAE6 y siRNAE7, en el pShuttle2.0 debido a que, además de contener en el poli-linker con los sitios enzimáticos adecuados para la clonación, proporciona los sitios I-Ceu I y PI-Sce I, que flanquean una secuencia promotora del CMV, la secuencia de interés (siRNAE6/E7), y una secuencia poli A del SV40, los cuales son indispensables para la posterior ligación al DNA adenoviral lineal (Figura 12, panel B).

En este sentido, se obtuvieron los siguientes resultados: inicialmente, se mandaron a sintetizar oligonucleótidos con la finalidad de amplificar la secuencia silenciante siRNAE6 y siRNAE7, a partir de los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D, cuya validación funcional había sido comprobada [Salazar et al., 2011] (Figura 11, panel A). Los oligonucleótidos generados con los sitios *Apal* y *KpnI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, hibridaron exitosamente utilizando como DNA molde a los psiRNAE6D y psiRNAE7D (Figura 11, panel C). Se realizaron varias reacciones de PCR para obtener mayor concentración del producto amplificado y después éste se purificó como se menciona en la sección 7.2.1 de la metodología.

Una vez que se obtuvieron los amplificados, siRNAE6 y siRNAE7 así como el vector pShuttle2 necesarios, se procedió a una doble digestión simultánea con las enzimas *Apal* y *KpnI* durante 4 h a 37°C (Figura 12). Una vez que se digirieron con las mismas enzimas, tanto los insertos siRNAE6 y siRNAE7, como el vector, pShuttle2, se procedió al proceso de ligación. El producto de ligación fue utilizado para transformar *E. coli* competentes (Figura 13). Se sembraron 16 colonias de bacterias del crecimiento positivo de cada producto de ligación con relación vector:inserto 1:1, 1:3 y 1:5, para las transformaciones con el probable pShuttlesiE6. Para la construcción pShuttlesiE7, se sembraron 10 por cada relación. De éstas, se realizó un PCR de colonias positivas a 8 colonias por cada relación (Figura 14, Panel A, sólo se muestran 3 por relación), de las cuales 5 resultaron con el amplificado de interés de alrededor de 600 pb, el siRNAE6. En la figura 14, panel A, se indica 3 colonias positivas en los recuadros rojo y amarillo. De éstas 5 colonias, se purificó el plásmido por miniprep y se mandaron a secuenciar (Figura 15). Dos clonas resultaron con la secuencia del promotor U6 y con la del inserto siRNAE6. Se amplificaron y purificaron dichos plásmidos por midiprep para obtener una mayor concentración para la siguiente etapa.

Para el caso de las clonas con el probable pShuttlesiE7, se seleccionaron cinco clonas (Figura 14, panel B), se purificó el plásmido por miniprep y se mandaron a secuenciar. El resultado de la secuenciación no fue concluyente ya que sólo se apreció la secuencia hasta el promotor U6, por lo que se pretende diseñar otro oligonucleótido que se encuentre más al extremo 3' del que se utilizó. Por este motivo, los siguientes ensayos sólo se realizaron con la construcción pShuttlesiE6 que se obtuvo exitosamente.

7.2.2 Construcción del plásmido adenoviral recombinante con siRNAE6, pAd/siE6.

Para obtener el plásmido con el genoma del adenovirus con el siRNAE6 clonado, se escindió el cassette de expresión de la construcción pShuttlesiE6 mediante una doble digestión simultánea con *PI-SceI-Ceul* (Figura 15, panel B). La digestión se llevó a cabo de manera exitosa, por lo que se procedió a su ligación con el DNA lineal del adenovirus proporcionado por el sistema. Además, con la finalidad de tener un vector adenoviral reportero, también se digirió el pShuttle2/LacZ para escindir su cassette de expresión que contiene el gen de LacZ, después generar el plásmido adenovirus, y eventualmente, la partícula adenoviral con el gen LacZ.

Una vez sucedida la ligación, se transformaron bacterias *E. coli* competentes con el producto de ésta ligación, de la cual se obtuvo el crecimiento positivo de alrededor de 13 colonias (Figura 16). Con una micropipeta se tomó cada bacteria y se resuspendió en 20 uL de agua estéril. De los cuales, 10 uL se tomaron con DNA molde para un PCR de colonias positivas utilizando los oligonucleótidos proporcionados por el sistema para analizar clonas recombinantes (ver Figura 7 para observar su ubicación). El resto de la suspensión se cultivó en 5 mL de medio LB con ampicilina para su posterior purificación plasmídica. El resultado del PCR de colonias positivas demuestra que el 86% de las colonias fueron recombinantes, pues se observó una banda alrededor de 300pb producto de la hibridación del oligonucleótido sentido en el DNA adenoviral y del oligonucleótido antisentido en el cassette de expresión (Figura 16. panel E). Finalmente se tomaron dos cultivos con las colonias transformadas con el pAd/siE6 y uno con el control pAd/LacZ y se purificaron por midiprep (Figura 17, panel A). Se confirmaron los plásmidos recombinantes mediante un PCR usando los oligonucleótidos del sistema (Figura 7). Los tres plásmidos resultaron recombinantes (Figura 17, panel B).

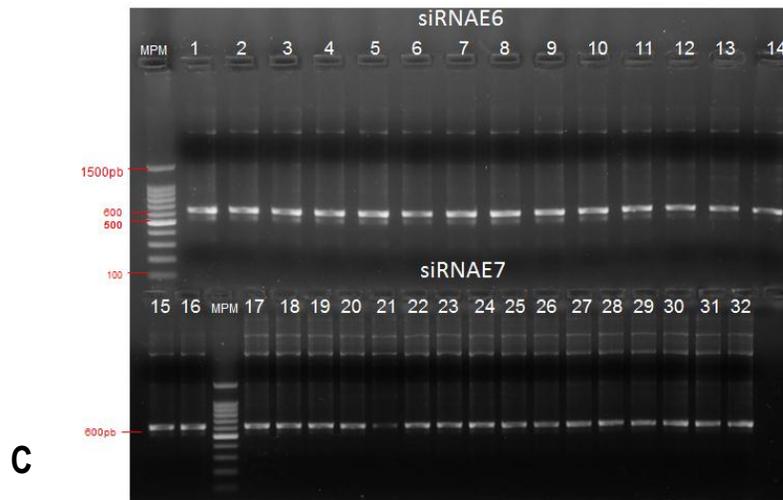
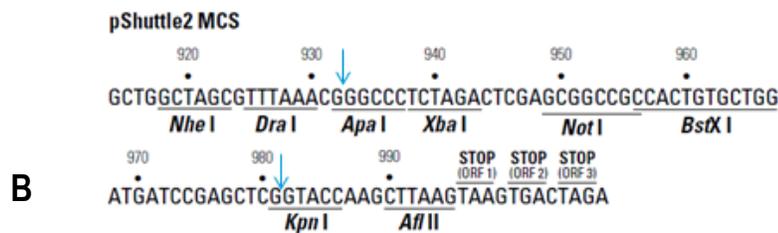
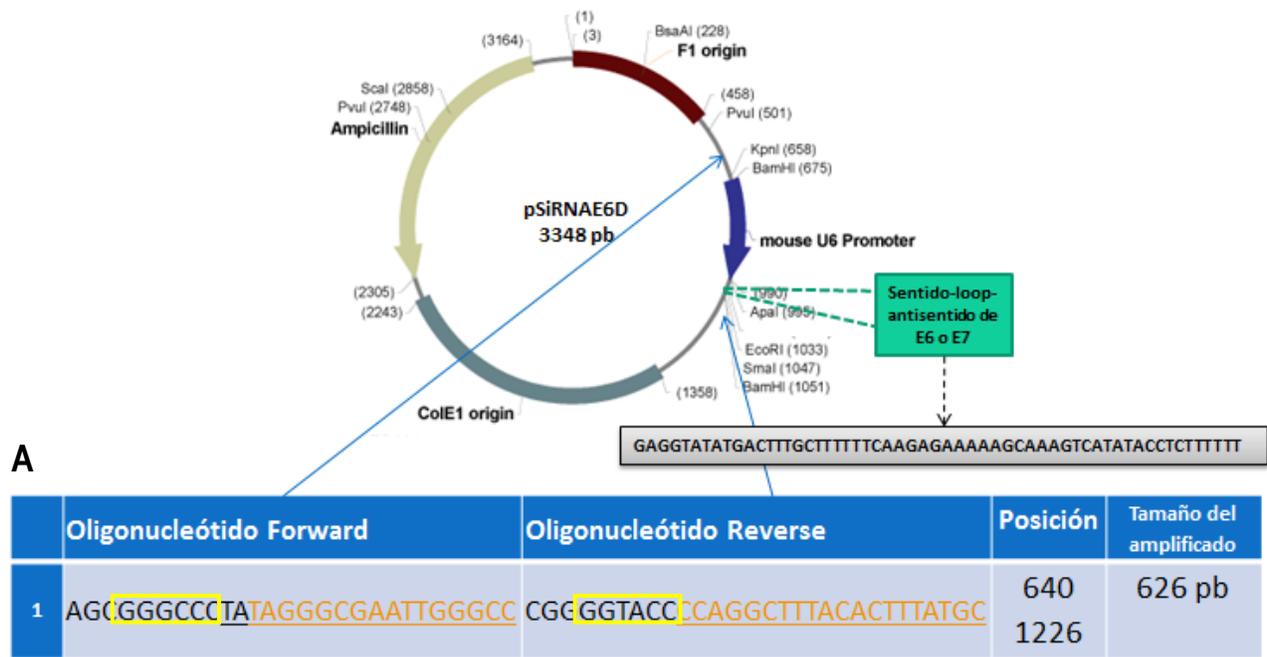


Figura 11. Amplificación de la secuencia silenciante de E6 y E7, siRNAE6 y siRNAE7, a partir de los plásmidos pSiRNAE6D y psiRNAE7D, respectivamente. A. Se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan la región río arriba del promotor U6 y río abajo del sitio *EcoR1* con un tamaño de 626pb, con la finalidad de amplificarla pues contiene el promotor U6 y el siRNAE6 o siRNAE7, respectivamente. Se le agregaron los sitios enzimáticos de restricción *ApaI* y *KpnI*, a los oligonucleótidos forward y reverse, respectivamente (Cuadros amarillos). B. Se seleccionaron estos sitios debido a que son compatibles con la región poli-linker del plásmidos en el que se clonó, pShuttle2. C. Amplificación del fragmento de 626 pb correspondiente a la secuencia silenciante siRNAE6 (carriles 1-16) y siRNAE7 (carriles 17-32).

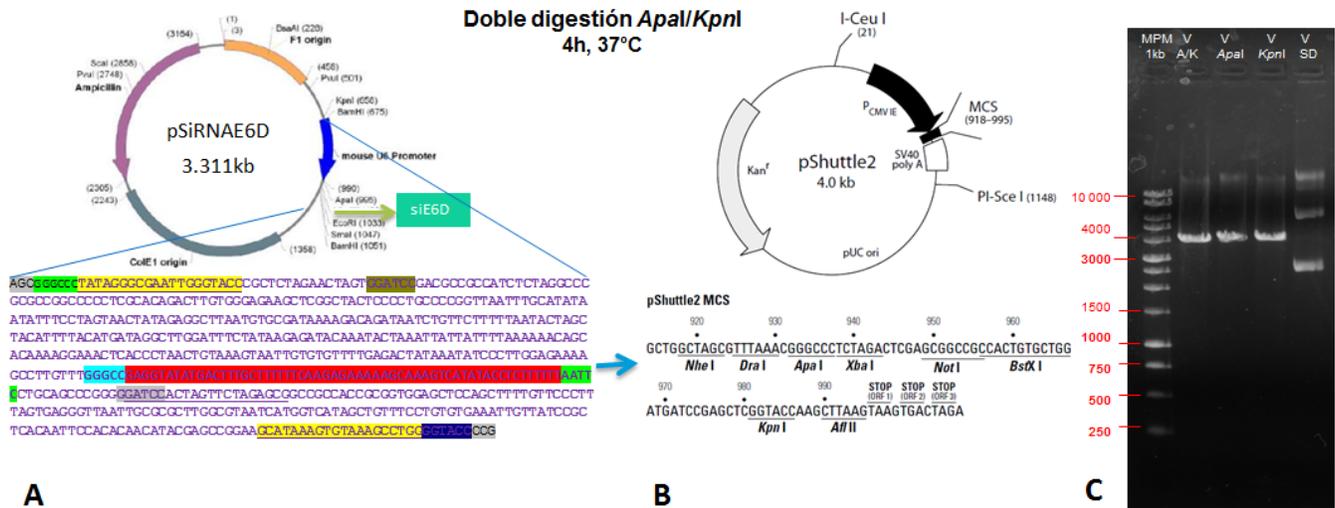


Figura 12. Doble digestión simultánea con *Apal* y *KpnI* de siRNAE6/E7 y de pShuttle 2.0. A y B. Se digirió simultáneamente con ambas enzimas durante 4 h a 37°C, al fragmento siRNAE6/E7 amplificado a partir del pSiRNAE6D/E7D y al vector de transferencia pShuttle2. C. Linearización del pShuttle2 mediante la digestión con *Apal/KpnI*, *Apal* y *KpnI* (carriles V, A/K; V, *Apal*; V, *KpnI*), el cual corresponde a un tamaño 4 kb indicado por el proveedor. Se observa que la mayoría del vector se encuentra digerido por las enzimas comparado con el control (vector sin digerir (carril V, SD)).

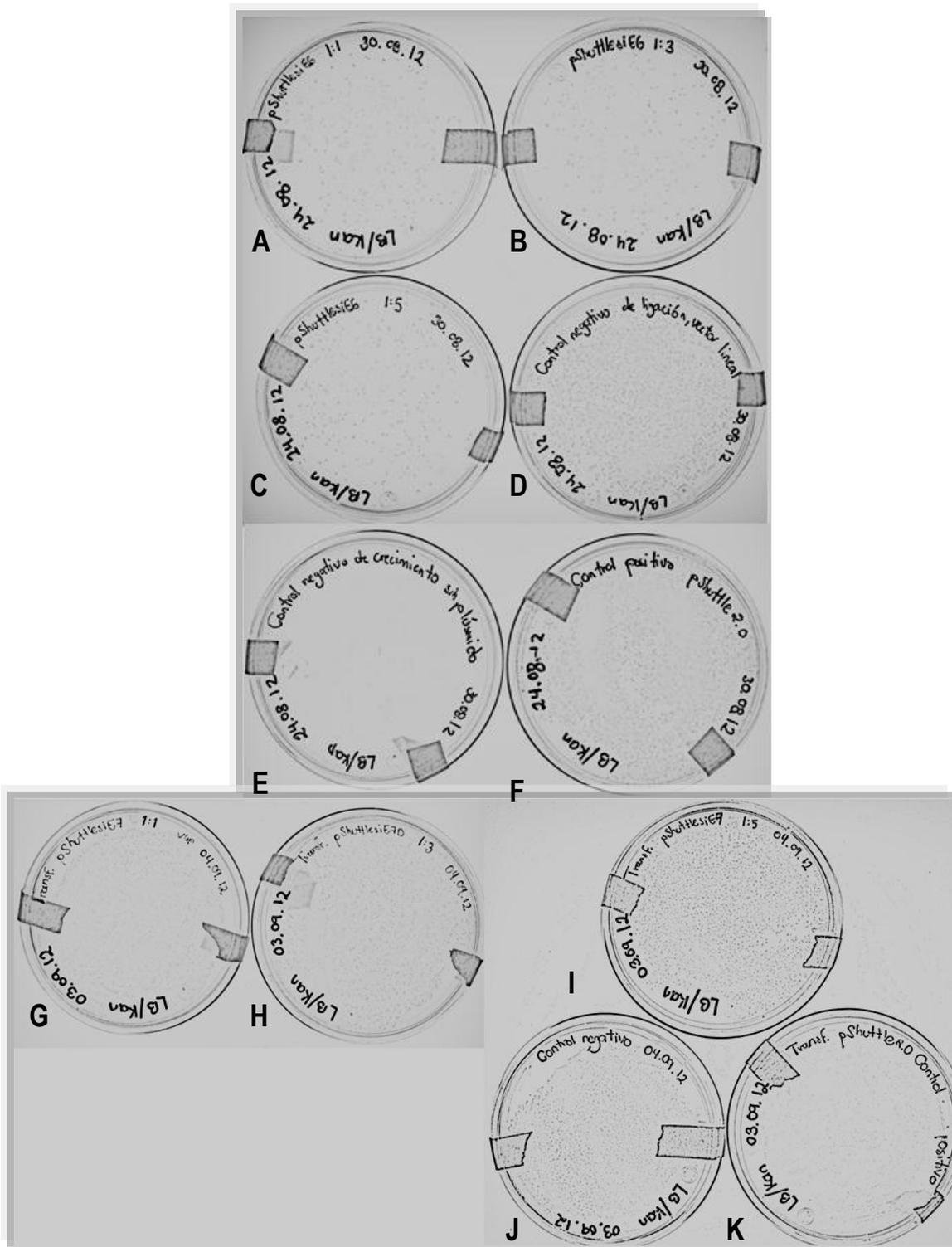


Figura 13. Crecimiento de bacterias transformadas con el producto de ligación del pShuttle 2.0 y el siRNAE6/E7. A, B, C, G, H, I. Bacterias transformadas con el producto de la ligación de la relación vector:inserto, pShuttle:siRNAE6/E7 1:1, 1:3 y 1:5. D. J. Control negativo de la ligación, transformación con el vector lineal. Hay crecimiento bacteriano debido a la probable parcial digestión con *Apal/KpnI*. F, K. Controles positivos de transformación. El crecimiento de la transformación con pShuttle2 vacío fue exitoso. E. Control negativo de crecimiento. Las bacterias competentes no crecieron en la placa LB con kanamicina.

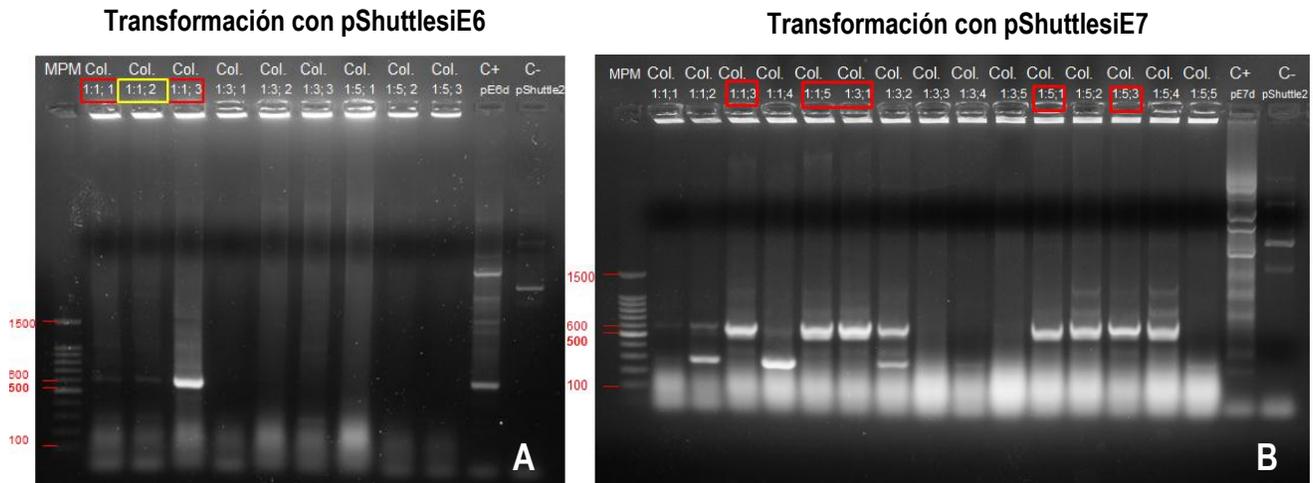


Figura 14. Amplificación de la región siRNAE6/E7 de las clonas transformadas por la ligación generada, pShuttlesiE6/E7, respectivamente. A. PCR colony de 3 colonias transformadas con el producto de ligación de la relación vector:inserto, pShuttle:siRNAE6 (carril 1:1;1, relación vector:inserto 1, 2 y 3). Se observa un amplificado de alrededor de 600 pb en las clonas con los recuadros, de las cuales se purificaron sus plásmidos por miniprep y se mandaron a secuenciar. De la clona 1:1;2 (cuadro amarillo), se validó el amplificado por secuenciación. B. PCR colony de 5 colonias transformadas con el producto de ligación de la relación vector:inserto, pShuttle:siRNAE7 (carril 1:1;1, relación vector:inserto 1, 2, 3, 4, 5). Se mandaron a secuenciar las cinco clonas con el recuadro rojo, sin embargo, la secuenciación no se llevó a cabo completamente. Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para amplificar el siRNAE6/E7 a partir del psiRNAE6D/E7D.

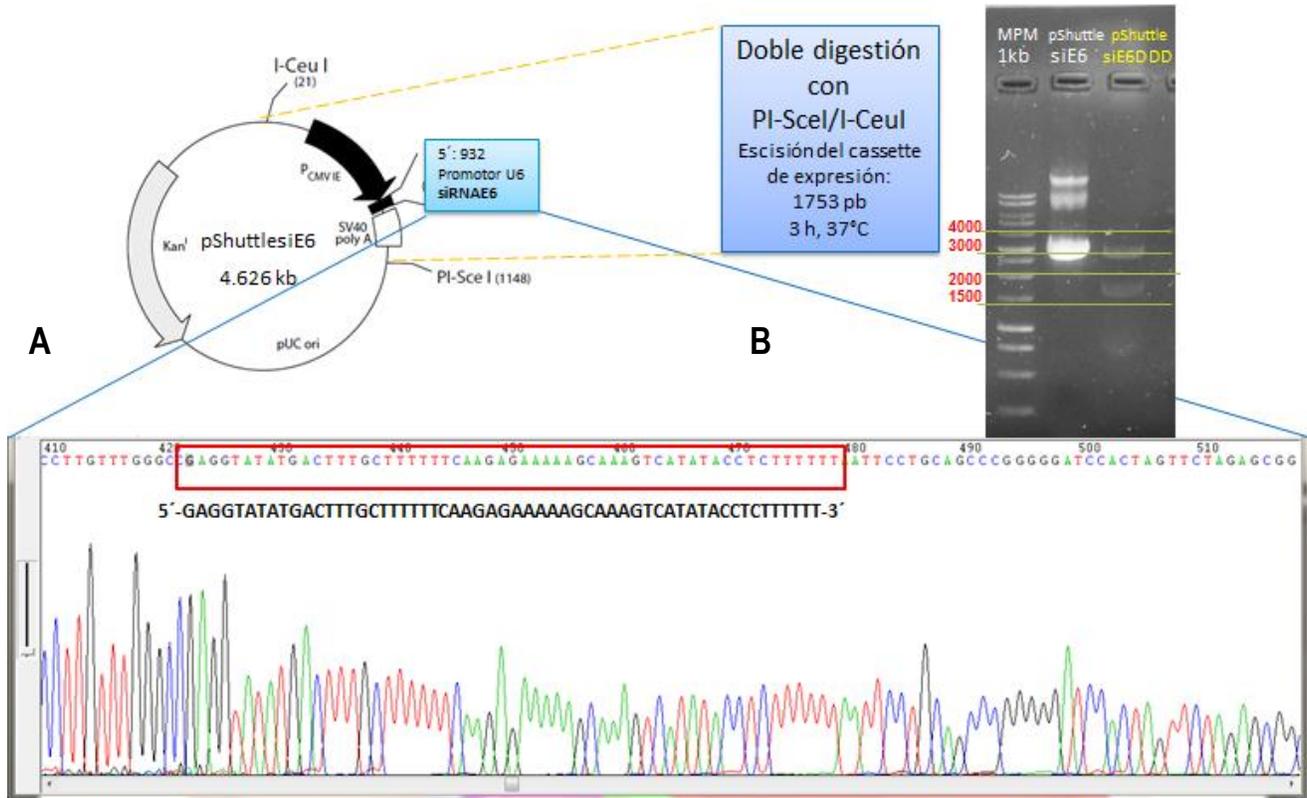


Figura 15. Confirmación de la construcción pShuttlesiE6 mediante secuenciación y digestión con PI-SceI/I-CeuI. Se obtuvieron dos clonas positivas al PCR colony con los oligonucleótidos diseñados inicialmente para amplificar el siRNAE6/E7 a partir del psiRNAE6D/E7D. Se cultivaron y purificaron sus plásmidos por miniprep y se mandaron a secuenciar. A. La secuencia analizada por la Unidad de secuenciación del IBT, fue la misma que se esperaba teóricamente, se encontró tanto el promotor U6 como el siRNAE6 (secuencia mostrada en el cuadro). B. La escisión del cassette de expresión mediante la doble digestión con PI-SceI/I-CeuI demuestra los fragmentos de la construcción con el tamaño molecular esperado. Éstos estuvieron alrededor de 3000 pb y 700 pb, éste último corresponde al cassette de expresión que incluye el siRNAE6.

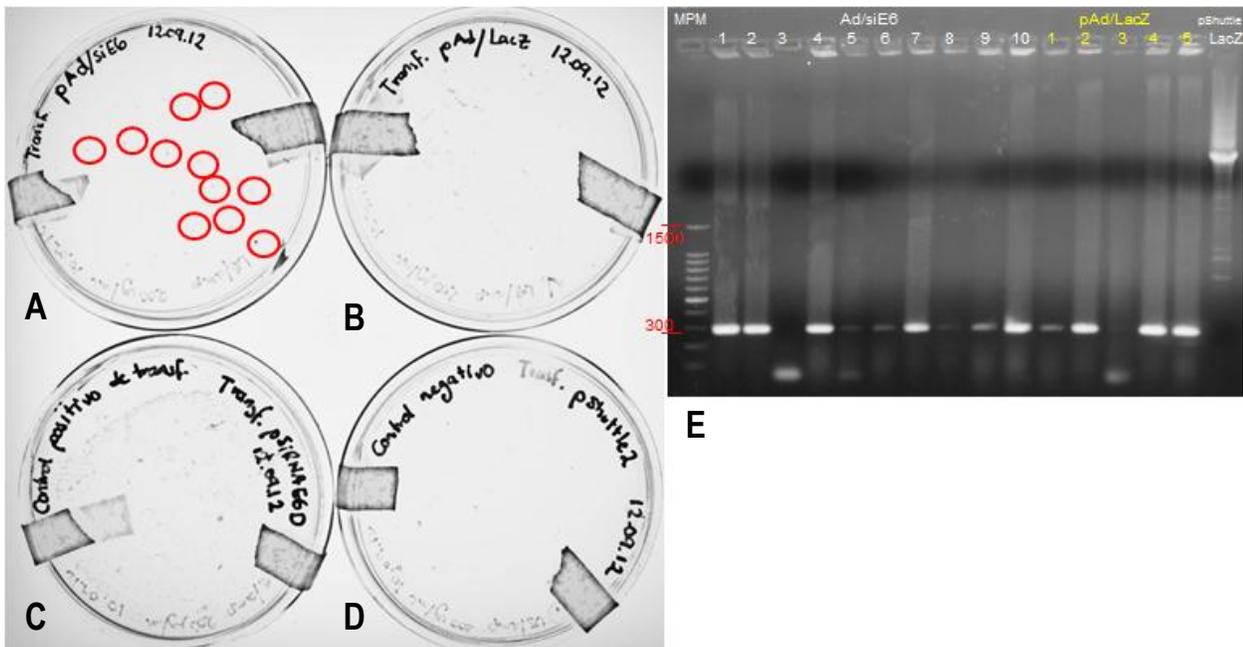


Figura 16. Crecimiento y confirmación de las clonas transformadas con el producto de ligación del genoma adenoviral lineal con el cassette de expresión con el siRNAE6. A y B. Crecimiento positivo de clonas transformadas con el producto de ligación, pAd/siE6, pAd/LacZ. C y D. Los controles positivo y negativo de transformación resultaron afirmativos. E. Se confirmó la presencia de construcciones recombinantes mediante un PCR colony con los oligonucleótidos proporcionados por el sistema. Se observó una banda de aprox. 300 pb esperada para las clonas recombinantes en 13 bacterias.

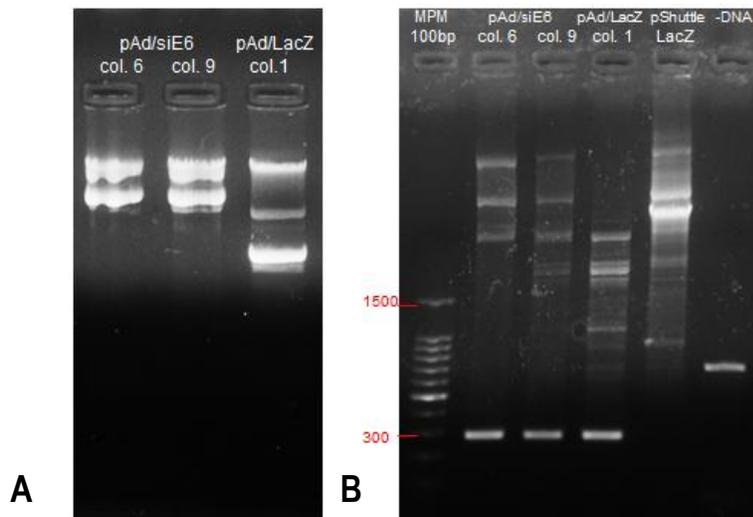


Figura 17. Construcciones de plásmidos recombinantes con el cassette de expresión que incluye el siRNAE6. A. Plásmidos adenovirales recombinantes, pAd/siE6 y el control, pAd/LacZ purificados por midiprep. B. Confirmación de las clonas recombinantes mediante un PCR utilizando los oligonucleótidos del sistema Adeno-X™ Expression System 1 de Clontech. En los tres plásmidos se observa una banda de alrededor de 300pb (carriles pAd/siE6 col.6 y col.9, pAd/LacZ col.1).

7.3 Establecimiento del modelo experimental tumoral murino HPV16+.

Para la estandarización del modelo experimental tumoral murino HPV16+, se siguió la metodología previamente descrita en la sección 7.4 (Figura 18, panel A). Es importante decir que este modelo murino fue establecido previamente por el grupo del Dr. Bermúdez, por lo que se nos proporcionaron las condiciones óptimas para la evaluación de plásmidos [Bermúdez-Morales, et al., 2009]. La mayor parte de los estudios reportan modelos *in vivo* para la evaluación de siRNAs en células HPV+ generados con ratones inmunodeficientes, lo que significa el uso de instalaciones especiales [Schuh, 2004], lo que repercute en el costo del proyecto de investigación, aunado a la carencia de infraestructura en muchos laboratorios mexicanos. El modelo murino HPV16+ utilizado en este trabajo utiliza ratones de la cepa BALB/c y células de ratón transformadas con el genoma del HPV16 con las cuales se induce la formación del tumor. Esto supone una ventaja para la evaluación de otras moléculas en un modelo murino HPV16+ pues se puede establecer relativamente fácil en cualquier bioterio con cuidados asépticos.

En este trabajo sólo se logró generar los tumores para un experimento debido a que se tuvieron problemas de crecimiento con las células BMK16/myc, por lo que no fue posible evaluar la reproducibilidad y sensibilidad del sistema es reproducible para la evaluación de moléculas de interés terapéutico.

Con respecto al modelo experimental *in vivo*, un día después de la inoculación con las células BMK16/myc (transformadas con el genoma del HPV16), se pudo observar la formación de un tumor visible y palpable (Figura 18, panel B). Mientras que para las 48 h, se generó un tumor de un tamaño promedio de 34.75 mm³ con intervalo de 30-40 mm³ en el 98% de los ratones (el 2% de los ratones desarrollaron tumores de 45-50mm³). Debido a su facilidad para evaluar las variaciones en las dimensiones del tumor, se decidió evaluar el efecto de los plásmidos sobre el crecimiento de la masa tumoral al segundo día de crecimiento post-inoculación.

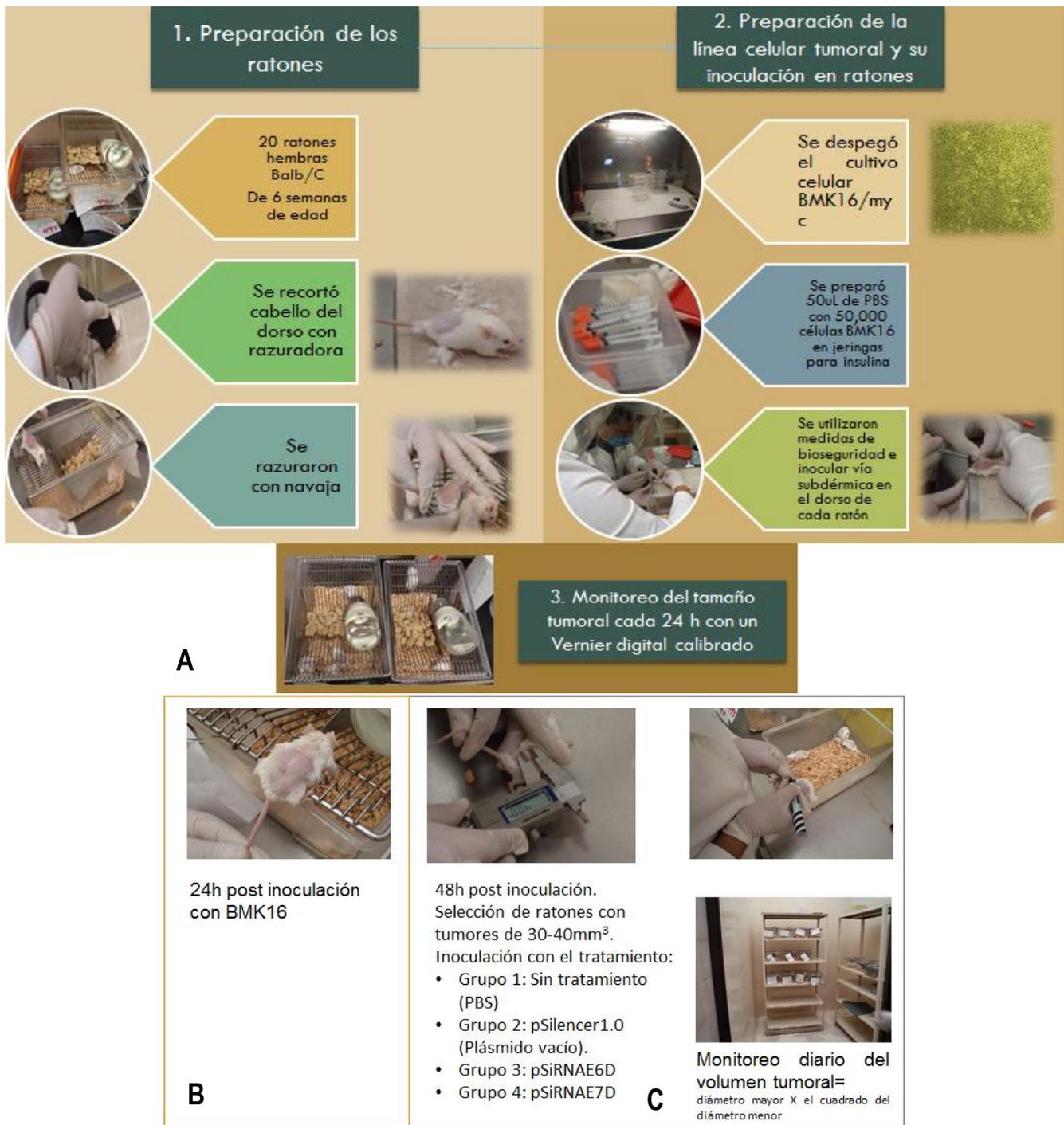


Figura 18. Modelo experimental murino HPV16+. A. Se solicitaron 20 ratones hembras de la cepa BALB/c al bioterio del INSP, los cuales fueron rizados de su parte dorsal. Por otra parte, se prepararon 10 cajas T75 con cultivo de células BMK16/myc, fueron disgregadas y separadas en alícuotas de 50 uL con 500,000 células en PBS estéril. Finalmente se procedió a la inoculación de las células en el dorso de cada ratón, y se monitoró diariamente su evolución hasta tener un tumor de 30-40mm³. B. En cada ratón, se observó el desarrollo de un tumor de 30-40 mm³ después de 48 h de la inoculación con las células BMK16/myc. Se seleccionaron los grupos de tratamiento y se les aplicó 50 ug de plásmido en un volumen de 20 uL de PBS vía subcutánea directamente en el tumor. El grupo 1 se inyectó con PBS (sin tratamiento), el grupo 2 con pSilencer1.0 (plásmido vacío), el 3 con psiRNAE6D y el 4 con psiRNAE7D. El monitoreo del tamaño del tumor se hizo diariamente midiéndolo con un vernier digital calibrado.

7.4 Evaluación del efecto antitumoral por la administración de los plásmidos, psiRNAE6D y psiRNAE7D, en el modelo tumoral murino HPV16+ mediante el análisis del desarrollo de la biomasa tumoral.

En este modelo, se evaluó el efecto sobre el crecimiento tumoral de los plásmidos, psiRNAE6D y psiRNAE7D, que expresan siRNAs para el silenciamiento de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del HPV16, respectivamente. Debido a que la fase experimental para la generación de las partículas adenovirales que expresan siRNAs para el silenciamiento de E6 y E7 no se concluyó en su totalidad en la presente tesis, sólo se realizó la evaluación del efecto antitumoral en un modelo murino HPV16+, de los plásmidos purificados a gran escala.

Una vez que los ratones mostraron una masa tumoral promedio de 34.75 mm³ con intervalo de 30-40 mm³ (48 h post-inoculación celular), se formaron 4 grupos de experimentación (n de 3, 12 ratones en total): el grupo 1 fue designado sin tratamiento, al cual se le administró 20 uL de PBS (solvente de los plásmidos) de manera subcutánea directamente dentro del tumor observable. El grupo 2 fue tratado con 50 ug de plásmido vacío o sin secuencia silenciante, pSilencer1.0, disuelto en 20 uL de PBS. Al grupo 3 le fue administrado 50 ug del psiRNAE6D (silenciante de E6) disueltos en 20 uL de PBS estéril. Por último, el grupo 4 fue tratado con 50 ug del psiRNAE7D (silenciante de E7) disueltos en 20 uL de PBS estéril.

Al dar seguimiento diario, observamos tamaños tumorales variables a lo largo del tiempo y que cambiaban de acuerdo al tratamiento aplicado. Para el caso del grupo de ratones tratados con pSilencer1.0 (plásmido vacío) y sin tratamiento, después de 12 días desde la primera administración de PBS, se observaron tumores alargados, hinchados, enrojecidos y con costras superficiales a lo ancho del tumor, lo cual sugiere un proceso inflamatorio (Figura 19, panel A). Particularmente para el grupo tratado con el plásmido psiRNAE7D, silenciante de la oncoproteína E7, se observaron tumores más pequeños, con enrojecimiento menor y con menor superficie de costra (Figura 19, panel B), este resultado se puede apreciar de forma cuantitativa en la cinética de crecimiento tumoral (Figura 20).

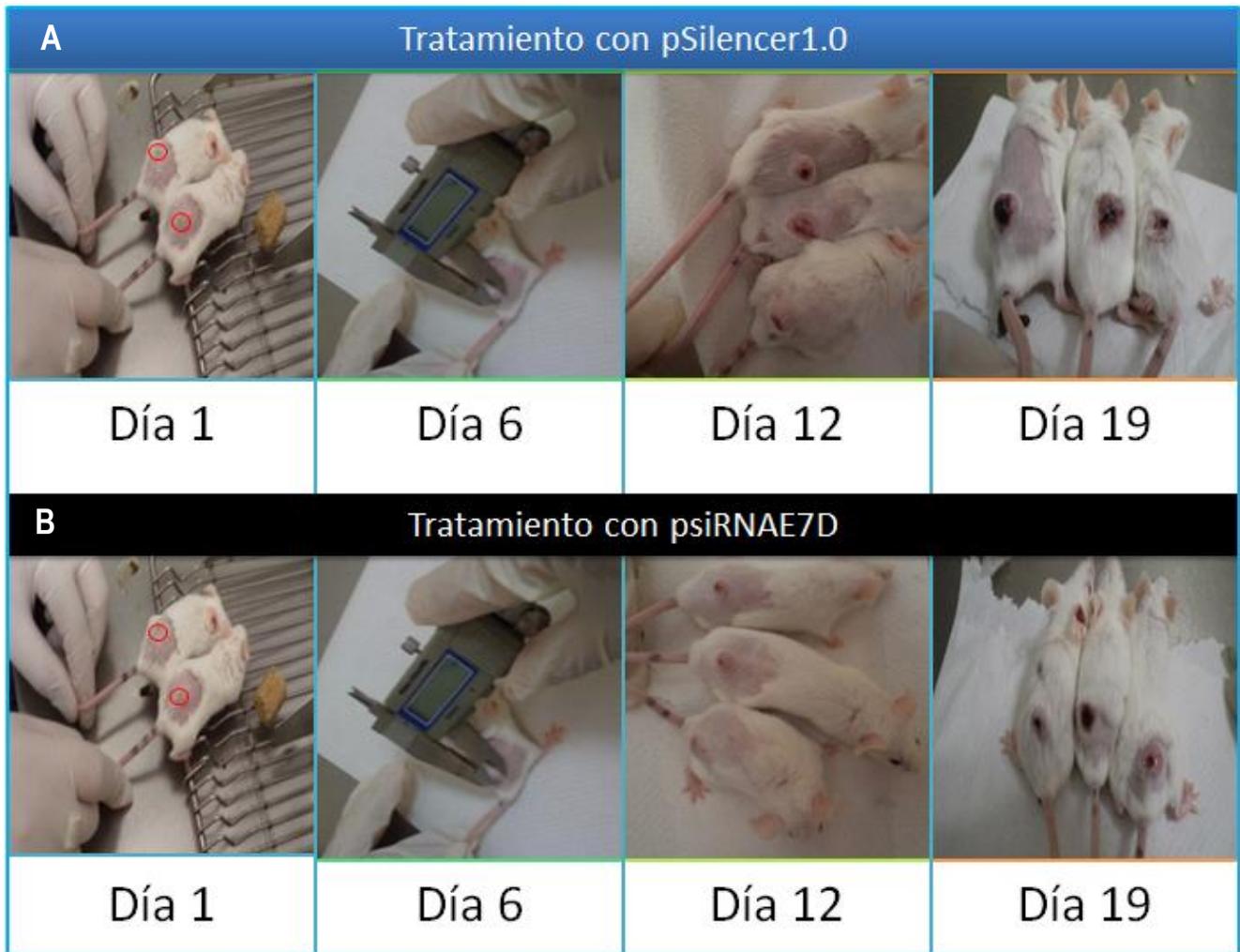


Figura 19. Efecto de la administración de los plásmidos pSilencer1.0 y psiRNAE7D en la apariencia física de los tumores inducidos HPV16+. A. Grupo de ratones con tumor inducido HPV16+ tratados con la administración del plásmido vacío, pSilencer1.0 en los días 1, 6, 12 y 19 desde la primera administración. B. Grupo de ratones con tumor inducido HPV16+ tratados con la administración del plásmido vacío, pSiRNAE7D en los días 1, 6, 12 y 19 desde la primera administración. En los días 1 y 6 pos tratamiento, en ambos grupos se observaron tumores similares. Sin embargo, al día 12 el tamaño de la masa tumoral, así como enrojecimiento y la presencia de costras superficiales eran de menor magnitud en el grupo tratado con el plásmido psiRNAE7D, silenciante de E7. En el último día de la cinética de crecimiento tumoral, el día 19, se observó que los tumores en el grupo tratado con psiRNAE7D, fueron de menor tamaño, menos enrojecidos así como con un área superficial de costras menor. Cabe mencionar que la imagen de los ratones al día 12, corresponde a tumores tratados con 2 administraciones de 50ug de plásmido (en los días 0 y 6). La imagen al día 19, corresponde a tumores tratados con 3 administraciones de 50 ug de plásmido, respectivamente.

En la Figura 20 se puede observar las cinéticas de crecimiento de los tumores de los 4 diferentes grupos de experimentación. Se puede percibir que el crecimiento de los tumores de los grupos control, sin tratamiento y tratado con el plásmido vacío, pSilencer1.0, fue muy similar. Por otra parte, se puede apreciar menor crecimiento de la masa tumoral en los grupos de ratones tratados con los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D, respecto a los grupos controles; sin embargo la diferencia no fue clara. Para resolver esta situación se decidió comparar las velocidades de crecimiento mediante el programa GraphPad Prism5 (Figuras 21-25), lo cual se describe a continuación.

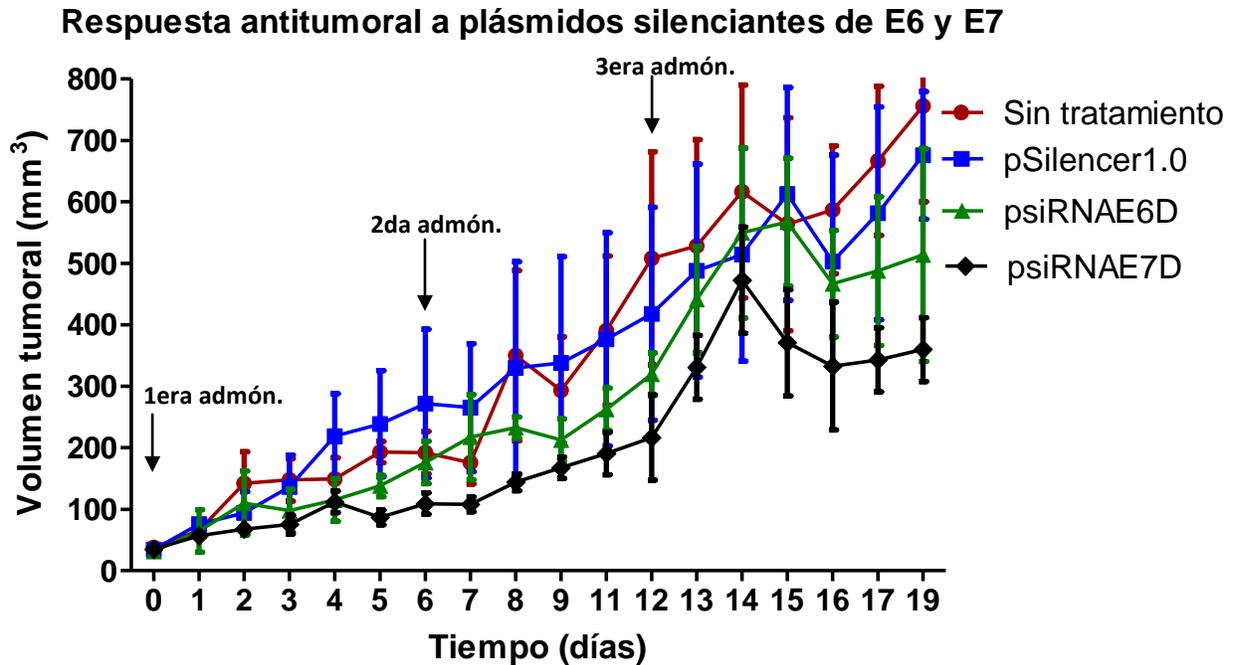


Figura 20. Efecto de la administración de plásmidos silenciadores de E6 y E7 en el crecimiento tumoral HPV16+. Cinética de crecimiento del tumor en el modelo experimental tumoral murino HPV16+ al administrar tres veces 50 ug de los plásmidos psiRNAE6D, psiRNAE7D y pSilencer1.0 cada seis días (indicado como 1era, 2da y 3era admón.). Se administró el tratamiento en los días cero, seis y doce, siendo el día cero el día que se obtuvo un tumor de 30-40mm³. Se observa el mismo comportamiento en la manera de crecimiento de tumor en los grupos control, es decir en el grupo sin tratamiento (línea roja) y con el pSilencer1.0 (línea azul). Además, se nota que con la administración con psiRNAE6D y psiRNAE7D, los tumores no crecieron tanto como en los grupos control (línea verde y negra). Esta información sugiere que la administración de los plásmidos silenciadores de E6 y E7 pudiera tener un efecto anticrecimiento. Sin embargo, se realizará un análisis de regresión lineal con la finalidad de saber su significancia así como la pendiente de la recta, el cual reflejará la magnitud de crecimiento para cada grupo de experimentación (Figuras 21-24).

7.4.1 Efecto de la administración del plásmido vacío, pSilencer1.0 y sin tratamiento en el crecimiento tumoral HPV16+.

La Figura 21 indica que el crecimiento tumoral en los grupos sin tratamiento y el tratado con el plásmido vacío, pSilencer1.0, tuvieron la misma velocidad de crecimiento, es decir, sus pendientes (pendiente de la recta) no fueron estadísticamente significativas ($p=0.25$). De hecho, los tumores del grupo sin tratamiento en promedio crecieron $38.01 \text{ mm}^3 \pm 3.14$ (IC95%: 31.71-44.32) diariamente; mientras que la velocidad de crecimiento del grupo tratado con el pSilencer1.0 fue $32.37 \text{ mm}^3 \pm 3.78$ (IC95%: 24.78-39.95) diarios. Esto sugiere que no hay efecto inespecífico debido a la administración con DNA plasmídico foráneo. En esta misma Figura se observa que los intervalos de confianza de ambas rectas se sobrelapan, lo cual significa que no son diferentes. En los análisis comparativos que a continuación se describen, se eligió como grupo control al tratado con el pSilencer1.0, debido a que es un plásmido que no contiene siRNAs, además de que se comprobó que los tumores crecieron en la misma proporción que en el grupo sin tratamiento.

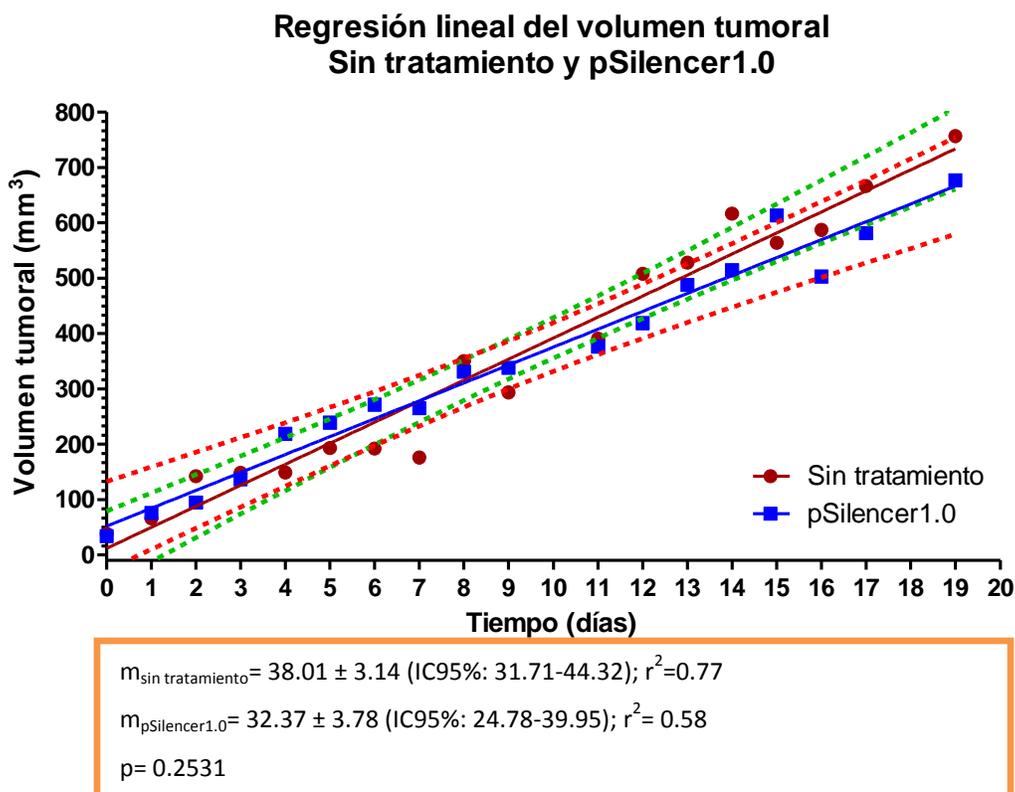


Figura 21. Efecto de la administración del plásmido vacío, pSilencer1.0 y sin tratamiento en el crecimiento tumoral HPV16+. Representación del análisis de la regresión lineal de ambas cinéticas de crecimiento tumoral (línea recta continua roja (sin tratamiento, $r^2=0.77$), línea recta sólida roja (con pSilencer1.0, $r^2=0.58$). Los valores de volumen tumoral monitoreados diariamente se representan con círculos rojos (sin tratamiento) y cuadros azules (con pSilencer1.0). Además, se grafican los intervalos de confianza de 95% para cada cinética (línea rectas discontinuas verdes (sin tratamiento) y rojas (para pSilencer1.0)). La pendiente de la recta para cada cinética fue de 38.01 para el grupo sin tratamiento; y 32.37 para el tratado con el pSilencer1.0 (recuadro naranja). El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism, el cual calculó una p de 0.25, lo que indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

7.4.2 Efecto de la administración de plásmidos silenciantes de E6, psiRNAE6D, en el crecimiento tumoral HPV16+.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la administración del plásmido que expresa siRNAs para el silenciamiento de E6 en el modelo tumoral murino, respecto al grupo control tratado con pSilencer1.0, se determinaron las velocidades del crecimiento tumoral de ambos grupos. La Figura 22, se observa que el crecimiento de los tumores del grupo tratado y el grupo tratado con psiRNAE6D no fueron estadísticamente diferentes ($p=0.49$) (Figura 22). Mientras que la velocidad de crecimiento (pendiente de la recta o m) fue de $32.37 \text{ mm}^3 \pm 3.78$ (IC95%: 24.78-39.95) diarios para el grupo control, para el grupo tratado con psiRNAE6D fue de $29.32 \text{ mm}^3 \pm 2.313$ (IC95%: 24.67-33.96) diarios. Este resultado indica que si bien los tumores tratados con el psiRNAE6D silenciante de E6, crecieron en menor proporción que los del grupo control, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

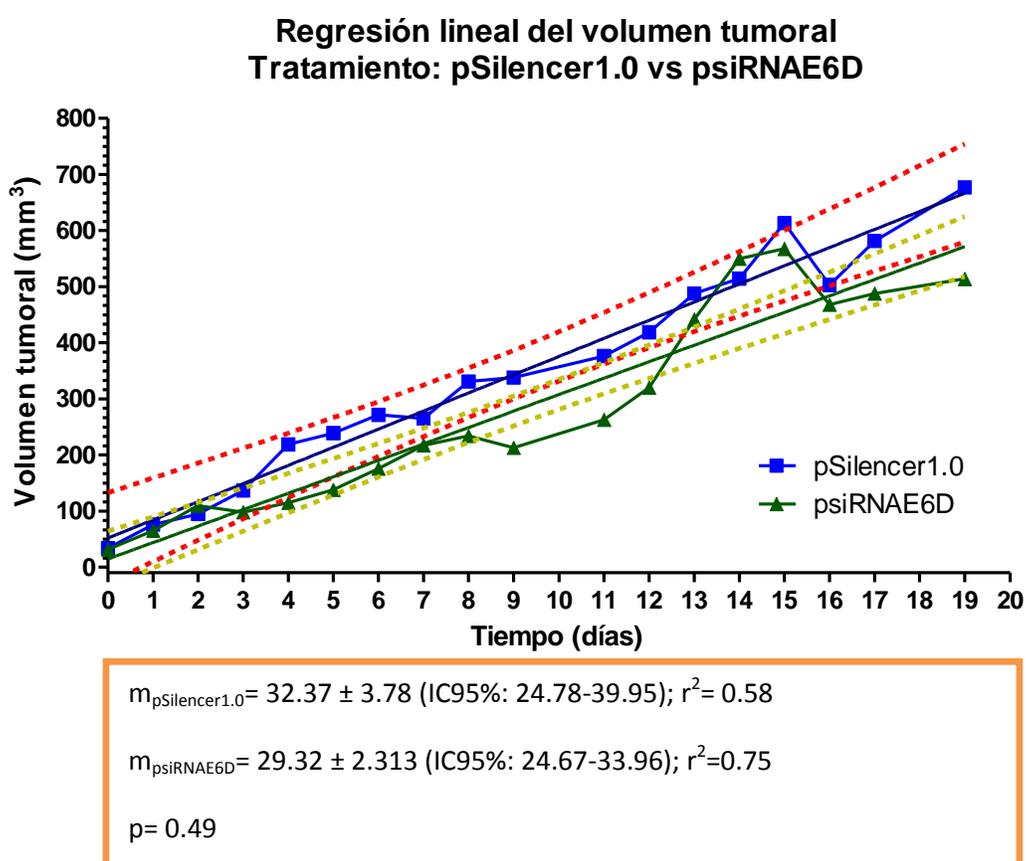


Figura 22. Efecto de la administración de plásmidos silenciantes de E6, psiRNAE6D y el control, pSilencer1.0 en el crecimiento tumoral HPV16+. Representación del análisis de la regresión lineal de ambas cinéticas de crecimiento tumoral (línea recta continua azul (tratamiento con pSilencer1.0, $r^2=0.58$), línea recta sólida verde (tratamiento con psiRNAE6D, $r^2=0.75$)). Los valores de volumen tumoral monitoreados diariamente se representan con cuadros azules (con pSilencer1.0) y con triángulos verdes (con psiRNAE6D). Además, se grafican los intervalos de confianza de 95% para cada cinética (líneas rectas discontinuas rojas (con pSilencer1.0) y verdes (con psiRNAE6D)). La pendiente de la recta para cada cinética fue de 32.37 para el grupo control tratado con el plásmido vacío, pSilencer1.0; y 29.32 para el tratado con el psiRNAE6D (recuadro naranja). El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism, el cual calculó una p de 0.49, lo que indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

7.4.3 Efecto de la administración de plásmidos silenciantes de E7, psiRNAE7D, en el crecimiento tumoral HPV16+.

De la misma manera que en la sección anterior, se compararon las velocidades de crecimiento de la masa tumoral del grupo tratado con el plásmido que expresa siRNAs para silenciar a E7, con el grupo tratado con el plásmido vacío pSilencer1.0. En la Figura 23, se observa que los intervalos de confianza de ambas cinéticas, no se traslaparon, además al comparar mediante una análisis de regresión lineal, nos confirmó que ambas pendientes fueron significativamente diferentes ($p=0.007$). La velocidad de crecimiento promedio para el grupo control fue de $32.37 \text{ mm}^3 \pm 3.78$ (IC95%: 24.78-39.95) diarios, comparado con $20.96 \text{ mm}^3 \pm 1.72$ (IC95%: 17.51-24.41) para el tratado con el psiRNAE7D (recuadro de la figura 23). Este resultado sugiere que la administración con el plásmido con siRNA para la oncoproteína E7, disminuye la velocidad de crecimiento significativamente en el 35% diariamente (comparado con el grupo control) en este modelo murino HPV16+.

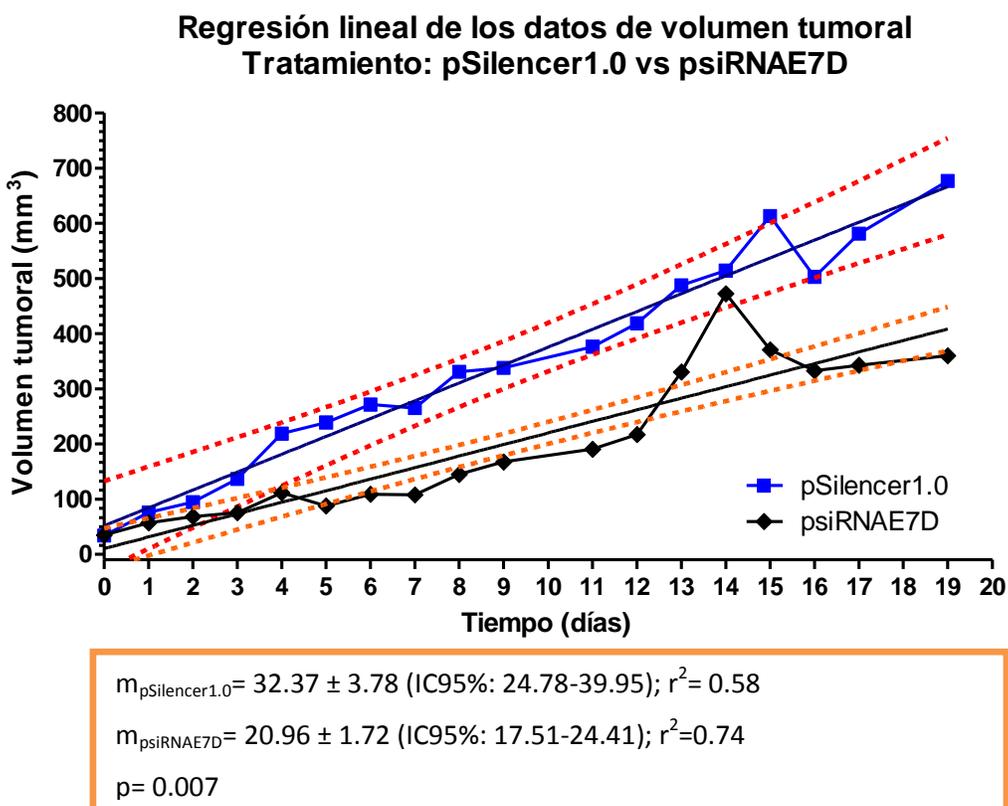


Figura 23. Efecto de la administración de plásmidos silenciantes de E7, psiRNAE7D y el control, pSilencer1.0 en el crecimiento tumoral HPV16+. Representación del análisis de la regresión lineal de ambas cinéticas de crecimiento tumoral (línea recta continua azul (tratamiento con pSilencer1.0, $r^2=0.58$), línea recta sólida negra (tratamiento con psiRNAE7D, $r^2=0.74$)). Los valores de volumen tumoral monitoreados diariamente se representan con cuadros azules (con pSilencer1.0) y con rombos negros (con psiRNAE7D). Además, se grafican los intervalos de confianza de 95% para cada cinética (líneas rectas discontinuas rojas (con pSilencer1.0) y naranjas (con psiRNAE6D)). La pendiente de la recta para cada cinética fue de 32.37 para el grupo control tratado con el plásmido vacío, pSilencer1.0; y 20.96 para el tratado con el psiRNAE7D (recuadro naranja). El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism, el cual calculó una p de 0.007, lo que indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

7.4.4 Efecto de la administración de plásmidos silenciadores de E6, psiRNAE6D, comparativamente la administración de psiRNAE7D, silenciador de E7, en el crecimiento tumoral HPV16+.

Se realizó un análisis comparativo entre la cinética de crecimiento de los tumores en el grupo tratado con el psiRNAE6D y el grupo tratado con el psiRNAE7D. Los resultados se resumen en la Figura 24, los cuales muestran que las velocidades de crecimientos de ambos grupos fueron estadísticamente diferentes ($p=0.0046$). La velocidad de crecimiento en el grupo tratado con el psiRNAE6D fue de $29.32 \text{ mm}^3 \pm 2.313$ (IC95%: 24.67-33.96) y de $20.96 \text{ mm}^3 \pm 1.72$ (IC95%: 17.51-24.41) diarios para el grupo tratado con el psiRNAE7D. Estos resultados sugieren que se evitaría el 28.5% del crecimiento de la masa tumoral si se tratara con el psiRNAE7D que con el psiRNAE6D.

Este resultado apunta a que sólo tratamiento con el plásmido psiRNAE7D parece inhibir el crecimiento tumoral, lo cual posiblemente dependa de problemas de estabilidad, dosis o solubilidad del psiRNAE6D, para poder ejercer un efecto en el modelo murino.

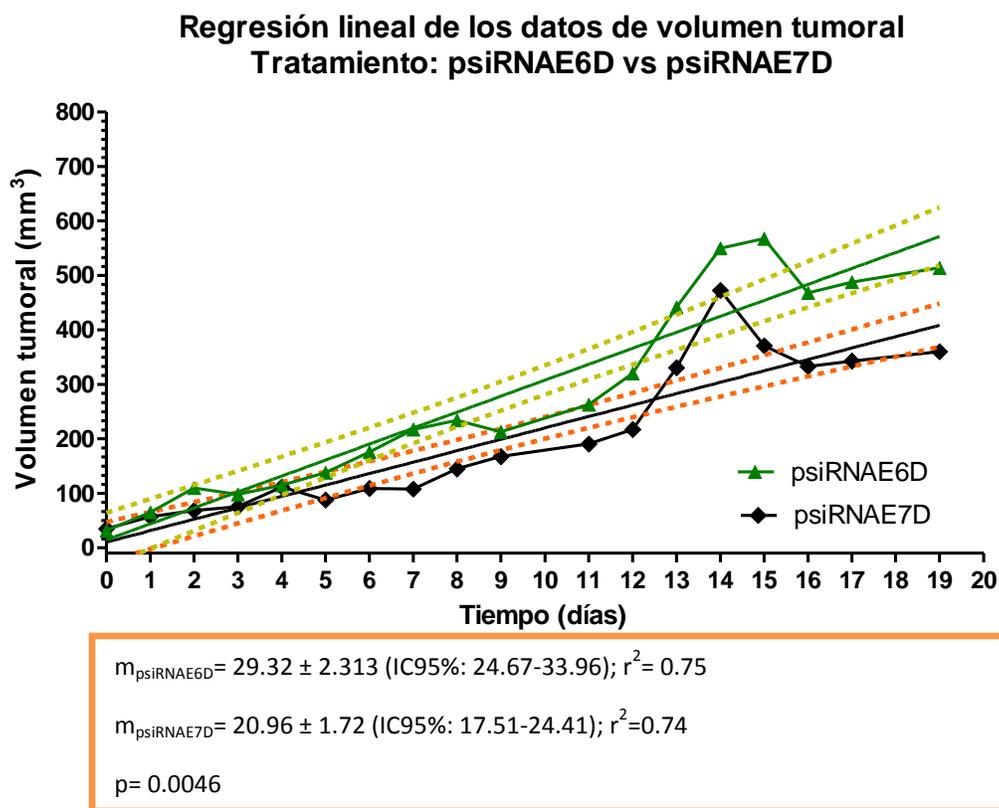
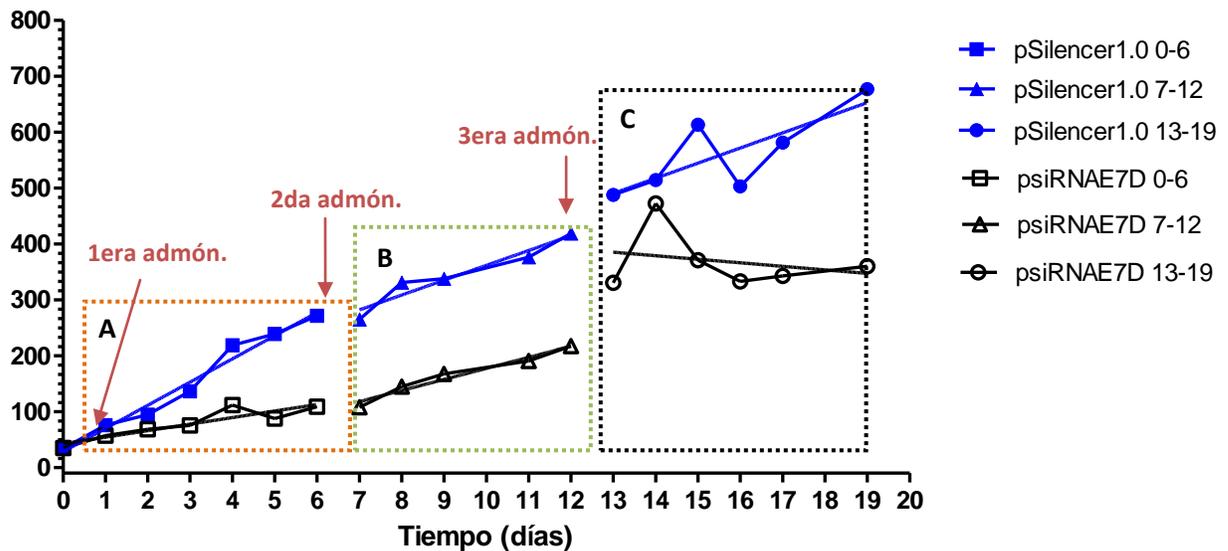


Figura 24. Efecto de la administración de plásmidos silenciadores de E6, psiRNAE6D, y de E7, psiRNAE7D en el crecimiento tumoral HPV16+. Representación del análisis de la regresión lineal de ambas cinéticas de crecimiento tumoral (línea recta continua verde (tratamiento con psiRNAE6D, $r^2=0.75$), línea recta sólida negra (tratamiento con psiRNAE7D, $r^2=0.74$)). Los valores de volumen tumoral monitoreados diariamente se representan con triángulos verdes (con psiRNAE6D) y con rombos negros (con psiRNAE7D). Además, se grafican los intervalos de confianza de 95% para cada cinética (líneas rectas discontinuas verdes (con psiRNAE6D) y naranjas (con psiRNAE7D)). La pendiente de la recta para cada cinética fue de 29.32 para el grupo tratado con el plásmido psiRNAE6D; y 20.96 para el tratado con el psiRNAE7D (recuadro naranja). El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism, el cual calculó una p de 0.0046, lo que indica que existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

7.4.5 Efecto en el crecimiento tumoral de la administración de los plásmidos pSilencer1.0 y psiRNAE7D en los días 0, 6 y 12 mediante el análisis de la pendiente.

Por otra parte, se evaluaron las velocidades de crecimiento de cada administración del plásmido a lo largo de los 19 días, esto es, se analizaron por separado los efectos en los días 0-6, 7-12 y 13-19, con la finalidad de ver como cambiaba la tendencia de crecimiento debido a su administración. Éste análisis sólo se realizó para la cinética de crecimiento tumoral con el tratamiento con psiRNAE7D debido a que fue en el que se encontró significancia estadística. El resultado de éste análisis se muestra en la Figura 25 (segmentos A, B y C, respectivamente). Se puede observar que con la primera administración del psiRNAE7D ocasionó un marcado efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral, con una velocidad de crecimiento de $11.70 \text{ mm}^3 \pm 2.17$ (IC95%: 7.149-16.25), con respecto al de $41.53 \text{ mm}^3 \pm 7.90$ (IC95%: 24.97-58.08) diarios, del grupo control, y siendo estadísticamente diferente ($P=0.0008$). No obstante, para la segunda administración, se observa claramente que ambas pendientes de la recta son iguales. Numéricamente el programa arrojó una tendencia de crecimiento en los días 6 al 12, de $26.55 \text{ mm}^3 \pm 29.53$ (IC95%:-37.24-90.35), para el grupo control, y $19.82 \text{ mm}^3 \pm 5.87$ (IC95%: 7.13-32.50) diarios, para el grupo tratado con psiRNAE7D. Este resultado sugiere que al administrar la segunda dosis de tratamiento, la velocidad de crecimiento tumoral no se inhibió ($p=0.82$) a pesar de que los valores entre ambas cinéticas de crecimiento son diferentes. Por otra parte, en la tercera administración, al día 12 de la cinética, fue negativa, -6.33 ± 11.11 (IC95%: -29.89-17.23), comparado con 27.08 ± 23.35 (IC95%: -22.43-76.58) del grupo control. A pesar de que las diferencias entre las pendientes de estas dos cinéticas no fueron significativas ($p=0.21$), en la Figura 25 se aprecia claramente el efecto antitumoral en los últimos días de la cinética, pues muestra la disminución del volumen tumoral, la cual también se pudo observar físicamente (Figura 19).

Regresión lineal de los datos de volumen tumoral en cada punto de tratamiento con pSilencer1.0 vs psiRNAE7D



m de pSilencer1.0 0-6 = 41.53 ± 7.90 (IC95%: 24.97-58.08); $r^2 = 0.59$
 m de psiRNAE7D 0-6 = 11.70 ± 2.17 (IC95%: 7.149-16.25); $r^2 = 0.60$
 p = 0.0008 A

m de pSilencer1.0 7-12 = 26.55 ± 29.53 (IC95%: -37.24-90.35); $r^2 = 0.58$
 m de psiRNAE7D 7-12 = 19.82 ± 5.87 (IC95%: 7.13-32.50); $r^2 = 0.46$
 p = 0.82 B

m de pSilencer1.0 13-19 = 27.08 ± 23.35 (IC95%: -22.43-76.58); $r^2 = 0.08$
 m de psiRNAE7D 13-19 = -6.33 ± 11.11 (IC95%: -29.89-17.23); $r^2 = 0.02$
 p = 0.21 C

Figura 25. Efecto en el crecimiento tumoral de la administración de los plásmidos pSilencer1.0 y psiRNAE7D en los días 0, 6 y 12 mediante el análisis de la pendiente. Representación del análisis de regresión lineal en cada administración del plásmido silenciante de E7, psiRNAE7D, y del control, pSilencer1.0. A. Regresión lineal de la cinética de crecimiento tumoral después de la primera administración con pSilencer1.0 (línea y cuadros azules; m de 41.53) y psiRNAE7D (línea y cuadros vacíos negros; m de 11.70) del día 0 al día 6. Los resultados de esta cinética comparando ambos grupos son estadísticamente significativos (p=0.008, recuadro naranja). B. Regresión lineal de la cinética de crecimiento tumoral después de la segunda administración con pSilencer1.0 (línea y triángulos azules; m de 26.55) y psiRNAE7D (línea y triángulos vacíos negros; m de 19.82) del día 6 al día 12. Las pendientes no son diferentes (p de m = 0.82). C. Regresión lineal de la cinética de crecimiento tumoral después de la tercera administración con pSilencer1.0 (línea y círculos azules; m de 26.55) y psiRNAE7D (línea y círculos vacíos negros; m de 19.82) del día 12 al día 19. Los resultados de esta cinética comparando las pendientes no son diferentes (p de m=0.21, recuadro verde).

8. *Discusión.*

8.1 Efecto de la administración de los plásmidos que expresan siRNAs para el silenciamiento de las oncoproteínas E6 y E7, psiRNAE6D y psiRNAE7D, en el modelo experimental tumoral murino HPV16+.

El estudio de Salazar et al., 2011, dio la pauta para esperar que la administración de los plásmidos psiRNAE6D y psiRNAE7D, reprimieran la expresión de los oncogenes E6 y E7 en el modelo tumoral HPV16+ generado, lo cual se reflejaría en un efecto antitumoral. De esta manera, lo que observamos en el presente trabajo fue que el tratamiento con el plásmido psiRNAE7D a los ratones con tumor inducido HPV16+, indujo una inhibición parcial del crecimiento de la masa tumoral comparativamente con los animales que no recibieron tratamiento o que se les administró el plásmido vacío. Sin embargo, esto no sucedió con la administración del plásmido psiRNAE6D, lo cual podría sugerir que tampoco hubo un efecto de inhibición de la expresión suficiente de la oncoproteína E6 y, por tanto, no provocó la inhibición de la masa tumoral.

El experimento del efecto de la administración de los plásmidos, psiRNAE6D y psiRNAE7D, se realizó una vez, no obstante, se pudo generar y normalizar el modelo murino experimental específicamente para éstos plásmidos, ya que el modelo había sido establecido para la evaluación de plásmidos que expresaban la proteína viral E2 [Bermúdez-Morales, et al., 2009]. Se decidió administrar 50 ug de cada plásmido, ya que el modelo murino experimental se había establecido bajo estos parámetros pero con un plásmido que expresaba interleucina 12 (resultados no publicados). En este estudio, se vio un efecto antitumoral importante, debido a esto, se pensó que al administrarse los plásmidos, psiRNAE6D y el psiRNAE7D podría tener un mayor efecto antitumoral ya que actúan directamente en la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, las cuales promueven la carcinogénesis [López y Lizano, 2006; Lizano-Soberón, et al., 2009]. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere que probablemente se requiera de un vehículo que aumente su transgénesis y con ello su actividad silenciadora con consecuencias en el crecimiento tumoral de células HPV16+.

Los trabajos reportados en este tema utilizan concentraciones menores de 50 ug, sin embargo, ellos utilizan siRNAs sintéticos, los cuales ya están procesados y listos para reclutar el complejo RISC y degradar el mensajero específico; no obstante son menos estables que los plásmidos [Jiang, et al., 2002; Yoshinouchi 2003; Niu, et al., 2006; Fujii, et al., 2006]. Sin embargo, una limitante importante de este proyecto fue que no se evaluó la inhibición de la expresión de las oncoproteínas una vez administrados los plásmidos de interés, lo cual dificulta el poder comparar con otros estudios.

Si bien no se redujo el tamaño inicial de la masa tumoral una vez que se aplicó el tratamiento con los psiRNAE6D y psiRNAE7D, el resultado sugiere que los tumores en éstos grupos, no crecieron tanto como los presentes en los grupos controles (grupo sin tratamiento y tratado con el plásmido vacío, pSilencer1.0). A diferencia de nuestro modelo *in vivo*, existen otros modelos donde tratan las células *in vitro* y después las inoculan en el ratón para observar el desarrollo del tumor [Yoshinouchi, et al., 2003; Gu, et al., 2006], esta estrategia podría ayudar para observar el efecto de los plásmidos antes de que se establezca el tumor, pues podría reflejar indicios de un posible tratamiento preventivo para evitar la formación de CaCU.

Por otra parte, se pudo observar que el tratamiento con el plásmido vacío no afectó el crecimiento tumoral, ya que crecieron con la misma tendencia que el grupo sin tratamiento, lo cual indica que la administración de pSilencer1.0 fue inocua como se

esperaba, pues no contiene ninguna secuencia silenciante y, aparentemente, no desencadena reacciones en el sistema inmune. Adicionalmente, se observó claramente que el grupo tratado con el psiRNAE7D no desarrolló el tumor en la misma magnitud como lo hicieron los grupos controles, ni siquiera con el tratamiento con el psiRNAE6D. En cuanto al tratamiento con el psiRNAE6D se observó una disminución del tamaño tumoral respecto a los controles, sin embargo, el análisis estadístico no mostró una diferencia significativa con respecto a la velocidad de crecimiento de la masa tumoral del grupo control. Se esperaba que este grupo disminuyera el tamaño tumoral en mayor medida que el resultado observado, pues ya se había validado la funcionalidad de la secuencia silenciante por otro grupo de investigación, tal como se menciona en los antecedentes de este trabajo [Jiang, et al., 2002], sin embargo es la primera vez que se emplea la secuencia de siRNAs clonada en un plásmido. Este resultado se puede explicar debido a la probable baja eficiencia de transgénesis dado que el plásmido fue administrado sin ningún vehículo que liberara el DNA dentro de las células tumorales [Patil, et al., 2005], de lo contrario se aseguraría el transporte de siRNAs al interior del núcleo celular y con ello incrementar la eficiencia de éstos.

En lo que respecta a la administración del psiRNAE7D, ésta tuvo mayor efecto en la disminución del crecimiento tumoral que la administración del psiRNAE6D, con una velocidad de crecimiento de $20.96 \text{ mm}^3 \pm 1.72$ (IC95%: 17.51-24.41) y $29.32 \text{ mm}^3 \pm 2.313$ (IC95%: 24.67-33.96) diarios, respectivamente. Es decir, la diferencia de crecimiento entre ambas aplicaciones es de 8.36 mm^3 , valor que refleja la masa tumoral promedio que se evitaría si se administrara el plásmido psiRNAE7D en lugar del psiRNAE6D. La eficiencia mayor del silenciamiento de E7 observada en este trabajo se sustenta con otros estudios en los que la inhibición de E7 tiene mayor efecto de anti-crecimiento y se induce directamente a apoptosis celular; mientras que el de E6 induce acumulación de p53 y la transactivación del gen de p21 para el control del ciclo celular, así como reducción del crecimiento celular [Jiang, et al., 2002; Jiang, et al., 2005]. Sin embargo, es importante mencionar que es posible que errores técnicos como la incorrecta administración del plásmido psiRNAE6D, no permitieran que el plásmido estuviera disponible para ingresar al interior de las células tumorales. Esto se hubiera podido verificar con el uso de algún gen reportero contenido en el plásmido, tal como la proteína verde fluorescente (GFP)

En el análisis de las secciones de la cinética de crecimiento tumoral de acuerdo a las administraciones realizadas, pudimos observar que la inyección con la primera administración de psiRNAE7D al día 0 con una masa tumoral promedio de 34.75 mm^3 con intervalo de $30\text{-}40 \text{ mm}^3$, disminuyó significativamente su tendencia de crecimiento. La velocidad de crecimiento disminuyó de $41.53 \text{ mm}^3 \pm 7.90$ (IC95%: 24.97-58.08) para el grupo control a $11.70 \text{ mm}^3 \pm 2.17$ (IC95%: 7.149-16.25) diarios para la primera administración con psiRNAE7D. Este resultado sugiere que el sistema tumoral está respondiendo a la transcripción de siRNAs que inhiben la expresión de E7, y debido a sus mecanismos referidos, está induciendo el control del crecimiento celular, e inclusive a partir del día 12 al 19, pudiera inducir apoptosis celular, ya que esta reportado su inducción [Jiang, et al., 2002; Jiang, et al., 2005]. Sin embargo, el resultado del crecimiento tumoral en todos los grupos experimentales en los días 12 al 19 tiene un comportamiento inusual, pues podría sugerir que el tumor deja de responder en esta ventana de tiempo, de manera que su crecimiento es similar al observado por el grupo control. En todo caso, se presume que precisamente en estos días hubo un error técnico en la medición de los tumores con el vernier utilizado, por lo que probablemente los resultados no sean confiables. Es particularmente marcada a la alteración de la respuesta por los

cambios “anómalos” entre los días 14 al 16. Adicionalmente, el crecimiento incontrolado del tumor puede provocar que el tumor se introduzca hacia los órganos internos del ratón, por lo que nuevamente los resultados pueden ser no confiables dado que una pequeña porción del tumor puede ser la que esté visible y se esté midiendo.

Al observar el comportamiento de las cinéticas de crecimiento tumoral de todos los grupos, podemos notar que el día 14 es un punto que se sale de la tendencia de crecimiento en todas las cinéticas, por lo que quitarlo podría arrojar resultados estadísticamente significativos. Sin embargo, no se tiene evidencia de que en ese día ocurrió un fallo técnico en su medición, por lo que no se procedió a la eliminación de ese punto.

En lo que respecta a la segunda administración con psiRNAE7D, se observó que no tuvo efecto en el crecimiento tumoral, resultado que no se esperaba dado que está reportado que una segunda administración mejora los resultados antitumorales [Fujii, et al., 2006; Niu, et al., 2006]. Sin embargo, se observó que después de la tercera administración de psiRNAE7D, el efecto de inhibición del crecimiento se volvió a observar: $27.08 \text{ mm}^3 \pm 23.35$ (IC95%: -22.43-76.58), para el grupo control a $6.33 \text{ mm}^3 \pm 11.11$ (IC95%: -29.89-17.23), para el grupo al cual se le administró psiRNAE7D. Esto sugiere que ocurrió una disminución de la masa tumoral en el grupo tratado. Sin embargo, es necesario repetir el experimento, pues como ya se comentó los resultados en los días 14 al 19 podrían no ser confiables. Aunado a esto, se observó que la naturaleza de las células BMK16/myc, utilizadas para la generación del tumor en el dorso del ratón, fue de crecimiento muy rápido. Creemos que el tamaño del tumor con el cual se inició el experimento fue lo suficientemente grande como para evitar su crecimiento. Es decir, que probablemente las células se establecieron eficazmente produciendo que el crecimiento tumoral fuera muy rápido y no se pudiera obtener un volumen tumoral menor a 40 mm^3 en 48h, haciendo poco posible la acción de un tratamiento antitumoral

Por otra parte, a pesar de que la velocidad de crecimiento tumoral se observa que disminuyó por efecto de la administración de psiRNAE7D, no se puede asegurar que el efecto final en su crecimiento al día 19, sea debido a la suma de las tres administraciones realizadas para cada plásmido en el modelo *in vivo*. Esto es debido a que se ha reportado que los transcritos tienen una vida media de 48 a 72 h [McCaffrey, et al., 2002], por lo que el efecto no se acumula dado que el rango de administración entre cada inyección fue de 6 días.

Aunque se hubiera esperado que el efecto de inhibición de crecimiento inducido por el plásmido psiRNAE7D no fuera tan evidente, dado que su mecanismo de acción requiere que las moléculas plasmídicas tengan acceso al núcleo celular una vez que entran en el citoplasma. Además de que el éxito del efecto de la administración de los plásmidos en un modelo *in vivo* depende de la cantidad de plásmido que se administre al tumor, tipo de administración, frecuencia, vehículo de liberación de DNA, absorción del plásmido dentro de la célula, sensibilidad, resistencia, sistema inmune circular y local, entre otras [Niu, et al., 2006]; la entrada de moléculas de plásmido dentro del núcleo debe ser mediante los poros nucleares. Este es un proceso difícil y extremadamente desafiante [Uherek y Wels, 2000], por lo que en este trabajo se comenzó la generación de adenovirus recombinantes que expresen los siRNAs silenciadores de E6 y E7.

8.2 Generación del adenovirus recombinante como vehículo para eficientar la transgénesis.

Con la finalidad de aumentar la transgénesis de los plásmidos a las células tumorales receptoras, se logró generar construcciones genéticas con el DNA de un adenovirus recombinante que contiene las secuencias siRNAE6 causantes del silenciamiento de la expresión de la oncoproteína E6. Además, se está trabajando para la obtención de la construcción con la secuencia siRNAE7, para el silenciamiento de la oncoproteína E7, pues surgieron problemas en la secuenciación de su respectivo siRNA.

Se decidió realizar un vector de tipo adenoviral deficiente en su replicación debido a varias ventajas. Los adenovirus son fáciles de manipular pues se conoce su genoma completo y su biología; se pueden obtener altos títulos virales en su producción, no se integra al genoma celular y tienen alta capacidad de inserción génica de 7 kb hasta 36 Kb, dependiendo del tipo de adenovirus a utilizar [Martínez-Flores & Jiménez-Orozco, 2006; Dormond, et al., 2009]. De tal forma que, esta estrategia representa una plataforma eficaz y con valor agregado para su posterior evaluación *in vivo* y su posterior utilización como terapia génica para el tratamiento de lesiones cervicales causadas por la infección con el HPV o casos de CaCU.

En este sentido, en la sección 8.4 se pueden apreciar los resultados que comprueban la generación de las construcciones pShuttlesiE6 y pShuttlesiE7, las cuales son producto de la ligación del vector de transferencia, pShuttle2, con las secuencias siRNAE6 y siRNAE7, respectivamente. No se continuó con experimentos utilizando el pShuttlesiE7 ya que hubo un fallo técnico en la secuenciación del siRNA. La generación de estas construcciones fue necesaria para la escisión de un cassette de expresión que provee el plásmido de transferencia pShuttle2.0, que contiene los sitios PI-Sce/I-Ceul, el promotor del citomegalovirus y la secuencia de interés, siRNAE6/E7, la cual es complementaria al RNA mensajero de E6 y E7, respectivamente. Éste cassette de expresión se ligó con el DNA lineal del adenovirus, que de igual manera, contenía los sitios PI-Sce/I-Ceul. Finalmente, se produjo la construcción genética pAd/siE6, con la cual posteriormente se pretende como perspectiva, linearizar y transfectar células HEK293 para la producción de partículas adenovirales con el genoma del adenovirus y las secuencias genéticas productoras de los siRNAs para la oncoproteína E6 y E7, de manera independiente.

9. Conclusión.

1. Se lograron amplificar y purificar a gran escala los plásmidos de expresión de siRNAs, psiRNAE6D y psiRNAE7D mediante un kit que los produce libres de endotoxinas para su aplicación en un sistema biológico.
2. Se logró la construcción genética de adenovirus que incluye la secuencia silenciante de la expresión de la oncoproteína E6, siRNAE6.
3. Se generó el modelo tumoral experimental murino HPV16+.
4. El tratamiento con el plásmido psiRNAE7D, en el modelo experimental murino HPV16+ disminuyó significativamente el crecimiento tumoral respecto al tratamiento con el plásmido vacío, psiRNAE6D y sin tratamiento.

10. Perspectivas.

En próximos experimentos, se pretende agregar variables de experimentación adecuadas para un exitoso modelo *in vivo* y la evaluación de estos plásmidos y partículas adenovirales recombinantes. Se propone evaluar la expresión de los oncogenes E6 y E7 de HPV16 por qRT-PCR, en el modelo experimental tumoral murino con el tratamiento para el silenciamiento de estos oncogenes. Las variables que se pretenden cambiar en los próximos ensayos son: el tamaño inicial del tumor, la concentración plasmídica y evaluar un grupo tratado con la combinación de ambos plásmidos, psiRNAE6D y psiRNAE7D. Además, se planea iniciar el experimento con un volumen tumoral de 20 a 30 mm³ en vez de 30 a 40 mm³. Adicionalmente será necesario evaluar los efectos antitumorales *in vivo* con cada administración que se requiera proporcionar al tumor de manera independiente para observar el efecto neto debido al número de administraciones realizadas.

11. Consideraciones éticas y de bioseguridad.

El manejo y disposición de los materiales biológico-infecciosos, corrosivos, reactivos, tóxicos y solventes se manejarán y confinarán de acuerdo a la Guía para el Manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), basada en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. El Investigador responsable del proyecto y el estudiante que realizará la presente tesis, tienen acreditación del curso de manejo integral de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos que ofrece el CISEI-INSP. Además, todas las áreas de trabajo tienen las características necesarias de requerimientos de bioseguridad para trabajo de laboratorios de acuerdo a la Guía para el Manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), basada en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. El procedimiento para el desarrollo del modelo tumoral murino se realizó de acuerdo con los lineamientos contenidos en el Manual para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Bioterio realizado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales (CICUAE). De igual manera se acataron las medidas recomendadas en el Reglamento del Bioterio del INSP.

12. Anexo.

Medio LB:

Para 1 L: 10 g de Peptona, 5 g de Extracto de Levadura, 10 g de NaCl. Aforar a 1 L con agua destilada. Realizar alícuotas y autoclavar.

Agar LB:

Para 500 mL: 5 g de Peptona, 2.5 g de Extracto de Levadura, 5 g de NaCl, 7.5 g de agar. Aforar a 500 mL. Autoclavar y vaciar en placas de Petri de plástico estériles.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS):

Disolver en 800 mL de H₂O destilada, 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44g de Na₂HPO₄, 0.24 g de KH₂PO₄. Ajustar el pH a 7.4. Aforar a 1 L con agua destilada y se autoclavar.

Buffer de carga con SDS (2X):

Tris-HCl (pH 6.8) 100 mM, SDS 4%(w/v), glicerol 20%(v/v), 200 mM β-mercaptoethanol.

Soluciones para la purificación de plásmidos adenovirales recombinantes:

Buffer 1: Tris-HCl 25mM (pH 8.0), EDTA 10 mM, glucosa 50 mM. Se autoclaveó y almacenó a 4°C.

Buffer 2: NaOH 0.2 M, SDS 1%. Se preparó al momento de utilizarlo. Se mantuvo en un recipiente bien tapado a temperatura ambiente

Buffer 3: KOAc 5 M. Se autoclaveó y almacenó a 4°C

Buffer 4: Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM, RNasa 20 ug/mL. Se adicionó la RNasa justo antes de utilizarla y se almacenó a -20°C.

13. Referencias bibliográficas.

- Aigner A. Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies *in vivo*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007 Aug;76(1):9-21. Epub 2007 Apr 25.
- Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Guzmán-Olea E, García-Carrancá A, Bahena-Román M, Alcocer-González JM, Madrid-Marina V. HPV 16 E2 protein induces apoptosis in human and murine HPV 16 transformed epithelial cells and has antitumoral effects *in vivo*. *Tumour Biol*. 2009;30(2):61-72.
- Boulet, G., Horvath, C., Berghmans, S., & Bogers, J. Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(4), 810-817.
- Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene*. 2003 Sep 4;22(38):5938-45.
- CDC. C. p. (2007). Virus del papiloma humano: Información sobre el HPV para los médicos. Recuperado el 11 de noviembre de 2011, de CDC: <http://www.cdc.gov/std/hpv/common-clinicians/sp/ClinicianBro-Sp-fp.pdf>
- Chang, J.-C., Kuo, T.-F., Y-J, C., Chiu, C.-C., Y-C, L., H-F, L., y otros. Highly potent and specific siRNAs against E6 or E7 genes of HPV16- or HPV-18-infected cervical cancers. *Cancer Gene Therapy* 2010;17, 827–836.
- Chen M, Du Q, Zhang HY, Wahlestedt C, Liang Z. Vector-based siRNA delivery strategies for high-throughput screening of novel target genes. *J RNAi Gene Silencing*. 2005 Jul 27;1(1):5-11.
- Choo CK, Ling MT, Suen CK, Chan KW, Kwong YL. Retrovirus-mediated delivery of HPV16 E7 antisense RNA inhibited tumorigenicity of CaSki cells. *Gynecol Oncol*. 2000 Sep; 78(3 Pt 1):293-301.
- Correa De Adjounian, M. F., Adjounian, H., & Adjounian, S. H. Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia: Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *AVFT* 2008; 27(1), 22-25.
- Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*. 2003 Feb 15;17(4):438-42.
- Dormond, E., Perrier, M., & Kamen, A. From the first to the third generation adenoviral vector: What parameters are governing the production yield? *Biotechnology Advances* 2009; 27, 133-144.
- Dormond, E., Perrier, M., & Kamen, A. From the first to the third generation adenoviral vector: What parameters are governing the production yield? *Biotechnology Advances* 2009; 27, 133-144.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 494-498.
- Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology*. 2011 Jun 3;8:269.
- Fire, A., et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806-11.

Fujii T, Saito M, Iwasaki E, Ochiya T, Takei Y, Hayashi S, Ono A, Hirao N, Nakamura M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Aoki D. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncol*. 2006 Sep;29(3):541-8.

GenBank: AF402678.1. NCBI. [En línea]. Human papillomavirus type 16 Asian-American variant, complete genome. Recuperado el 31 de Enero de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF402678.1>

Gu W, Putral L, Hengst K, Minto K, Saunders NA, Leggatt G, McMillan NA. Inhibition of cervical cancer cell growth in vitro and *in vivo* with lentiviral-vector delivered short hairpin RNA targeting human papillomavirus E6 and E7 oncogenes. *Cancer Gene Ther*. 2006 Nov;13(11):1023-32. Epub 2006 Jun 30.

Gu W, Putral L, McMillan N. siRNA and shRNA as anticancer agents in a cervical cancer model. *Methods Mol Biol*. 2008;442:159-72.

Hallez S, Detremmerie O, Giannouli C, Thielemans K, Gajewski TF, Burny A, Leo O. Interleukin-12-secreting human papillomavirus type 16-transformed cells provide a potent cancer vaccine that generates E7-directed immunity. *Int J Cancer*. 1999 May 5;81(3):428-37.

Hamada, K., Sakaue, M., Alemany, R., Zhang, W.-W., Horio, Y., Roth, J. A.. Adenovirus-Mediated Transfer of HPV 16 E6/E7 Antisense RNA to Human Cervical Cancer Cells. *Gynecologic Oncology* 1996; (63), 219–227.

Hausen, H. z. (1977). *Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 78, 1-30.

Hibma, M.H., Tommasino, M., Van Nest, G., Ely, S. J., Contorni, M., Rappuoli, R.C.L.V. Immune responses to HPV16 E7. In: M.A. Stanley (ed.), *Immunology of human papillomaviruses* 1994, pp. 291–297.

Horvath, C. A., Boulet, G. A., Renoux, V. M., Delvenne, P. O., & J, B. J. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology Journal* 2010; 7(11), 1-7.

Huang, L.-W., Seow, K.-M., Lee, C.-C., Lin, Y.-H., Pan, H.-S., & Chen, H.-J. Decreased p21 Expression in HPV-18 Positive Cervical Carcinomas. *Pathol. Oncol. Res* 2010; (16), 81–86.

Instituto Nacional del Cáncer. (29 de Diciembre de 2011). Vacunas contra los virus del papiloma humano. Recuperado el 19 de Julio de 2012, de Hoja Informativa del Instituto Nacional del Cáncer: <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/prevencion/vacuna-VPH>

Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene E6 and E7 expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells using small interfering RNAs. *Methods Mol Biol* 2005;292:401-20.

Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene* 2002 Sep 5;21(39):6041-8.

Jiang M, Rubbi CP, Milner J. Gel-based application of siRNA to human epithelial cancer cells induces RNAi-dependent apoptosis. *Oligonucleotides*. 2004 Winter;14(4):239-48.

Jouve, Nicolas: 2004. [En línea]. Transgénesis y terapia génica. Recuperado el 07 de diciembre de 2012, de http://www2.uah.es/benito_fraile/ponencias/transgenesis.pdf

Khalighinejad, N., Hariri, H., Behnamfar, O., Yousefi, A., & Momeni, A. Adenoviral gene therapy in gastric cancer: A review. *World Journal of Gastroenterology* 2008; 14(2), 180-184.

Koivusalo R, Krausz E, Helenius H, Hietanen S. Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA-mediated degradation of human papillomavirus 18 E6 mRNA: opposite effect of siRNA in combination with different drugs. *Mol Pharmacol.* 2005 Aug;68(2):372-82. Epub 2005 May 20.

Kuner R, Vogt M, Sultmann H, Bunes A, Dymalla S, Bulkescher J, Fellmann M, Butz K, Poustka A, Hoppe-Seyler F. Identification of cellular targets for the human papillomavirus E6 and E7 oncogenes by RNA interference and transcriptome analyses. *J Mol Med (Berl).* 2007 Nov;85(11):1253-62. Epub 2007 Jun 23.

Lea JS, Sunaga N, Sato M, Kalahasti G, Miller DS, Minna JD, Muller CY. Silencing of HPV 18 oncoproteins With RNA interference causes growth inhibition of cervical cancer cells. *Reprod Sci.* 2007 Jan;14(1):20-8.

Ledwaba, T., Dlamini, Z., Naicker, S., & Bhoola, K. Molecular genetics of human cervical cancer: role of papillomavirus and the apoptotic cascade. *Biol Chem* 2004; 385(8), 671-682.

Lizano-Soberón, M., Carrillo-García, A., & Contreras-Paredes, A. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología* 2009; 4, 205-216.

Lizano-Soberón, M., Carrillo-García, A., & Contreras-Paredes, A. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología* 2009; 4, 205-216.

López Saavedra, A., & Lizano Sobreón, M. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina. *Cancerología I* 2006; 31-55.

Martin D, G. J. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* 2009; 2, 31-42.

Martínez-Flores, F., & Jiménez-Orozco, F. A. Biología molecular de los vectores adenovirales. *Cir Ciruj* 2006; 74(6), 483-493.

McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature.* 2002 Jul 4;418(6893):38-9.

Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2002 May;20(5):497-500.

Niu XY, Peng ZL, Duan WQ, Wang H, Wang P. Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference *in vitro* and *in vivo*. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Mar-Apr; 16(2):743-51.

Organization, W. H. (s.f.). *Human Papillomavirus and Related Cancers*. Recuperado el 08 de Marzo de 2011, de Summary Report Update: http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/MEX.pdf?CFID=4796130&CFTOKEN=51862050

Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J.* 2005 Apr 8;7(1):E61-77.

Perales Ortiz, G., & Gómez Cerón, C. (Noviembre de 2009). Manual de Procedimientos para el Manejo de Sustancias CRETI Y RPBI . Recuperado el 25 de Junio de 2012, de http://www.insp.mx/images/stories/INSP/Docs/normateca/RegCientifica/120612_manual_CRETI_RPB I.pdf

Peralta-Zaragoza O, B.-M. V.-M. RNA interference: biogenesis molecular mechanisms and its applications in cervical cancer. *Rev Invest Clin* 2010; 62(1), 63-80.

Putral LN, Bywater MJ, Gu W, Saunders NA, Gabrielli BG, Leggatt GR, McMillan NA. RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. *Mol Pharmacol*. 2005 Nov; 68(5):1311-9. Epub 2005 Aug 24.

Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2004 Mar; 22(3):326-30.

Salazar-León, J., Reyes-Román, F., Meneses-Acosta, A., Merchant, H., Lagunas-Martínez, A., Meda-Monzón, E., y otros. (2011). Silencing of HPV16 E6 and E7 oncogenic activities by small interference rna induces autophagy and apoptosis in human cervical cancer cells. *J Nucleic Acids Investig*, 2(1), 59- 69.

Sanclemente, G., & Gill, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *European Academy of Dermatology and Venereology* 2002; 16, 231-240.

Schleiermacher, C., & Meyer, F. (4 de 07 de 2011). BiBiServ. Recuperado el 25 de 06 de 2011, de Gene Fisher Interactive Primer Design: <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/>

Schuh JC. Trials, tribulations, and trends in tumor modeling in mice. *Toxicol Pathol*. 2004 Mar-Apr;32 Suppl 1:53-66.

Sima, N., Wang, W., Kong, D., Deng, D., Xu, Q., Zhou, J.. RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53. *Apoptosis* 2008; 13(2), 273-81.

Sliva, K., & Schnierle, S. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology Journal* 2010; 7(248), 2-11.

The Journal of Gene Medicine [En línea]. *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide* 2007. Recuperado el 30 de Mayo de 2011, de <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>

Tijsterman M, Plasterk RH. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell*. 2004 Apr 2; 117(1):1-3.

Uherek C, Wels W. DNA-carrier proteins for targeted gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;44(2-3):153-166.

Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res*. 2004 Feb 9; 32(3):936-48.

UNAM, C. F. (s.f.). Comité de Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales. Manual de Organización y Procedimientos. Recuperado el 25 de Junio de 2012, de www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/manual.doc

Van der Krol, A.R., et al. Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol Biol* 1990; 14(4): 457-66.

Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* 2013 Jan;36(1):1-22. Epub 2013 Jan 1

Virus Taxonomy: 2009 Release. [En línea]. International Committee on Taxonomy of Viruses 2010. Recuperado el 22 de Diciembre de 2011, de <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>

Wang R, Lin F, Wang X, Gao P, Dong K, Wei SH, Cheng SY, Zhang HZ. The therapeutic potential of survivin promoter-driven siRNA on suppressing tumor growth and enhancing radiosensitivity of human cervical carcinoma cells via downregulating hTERT gene expression. *Cancer Biol Ther.* 2007 Aug;6(8):1295-301. Epub 2007 May 26.

White RJ. Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nat Rev Genet.* 2011 May 4;12(7):459-63.

WHO/ICO. *Human Papillomavirus and Related Cancers* 2010. Tercera edición.

Yamato K, Yamada T, Kizaki M, Ui-Tei K, Natori Y, Fujino M, Nishihara T, Ikeda Y, Nasu Y, Saigo K, Yoshinouchi M. New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer. *Cancer Gene Ther.* 2008 Mar;15(3):140-53. Epub 2007 Dec 21.

Yoshinari K, Miyagishi M, Taira K. Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Res.* 2004 Feb 3;32(2):691-9.

Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, Fen J, Koseki T, Ikeda Y, Nishihara T, Yamato K. *In vitro* and *in vivo* growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Mol Ther.* 2003 Nov; 8(5):762-8.

Zhang, Y., & Bergelson, J. M. Adenovirus Receptors. *J. Virol.* 2005; 79(19), 12125–12131.