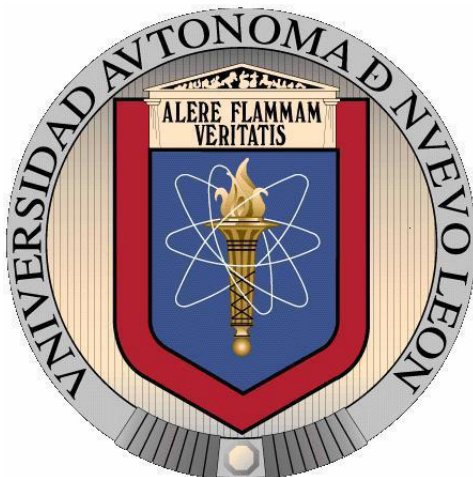


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**EFFECTO ANTITUMORAL DE LA FUSIÓN GÉNICA DEL ADYUVANTE
4-1BBL AL ANTÍGENO E7**

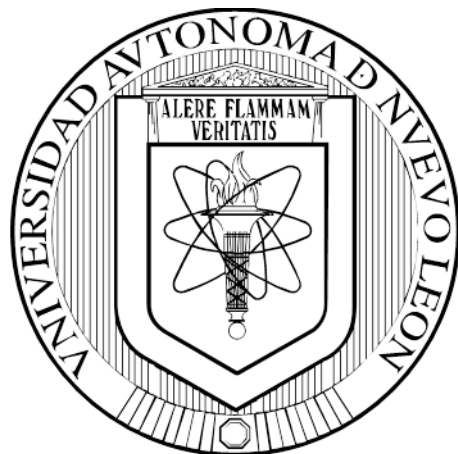
PRESENTA

L.B.G. NORMA ESTEFANÍA RAMÍREZ ÁVILA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

AGOSTO, 2017

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



TESIS

**EFFECTO ANTITUMORAL DE LA FUSIÓN GÉNICA DEL ADYUVANTE
4-1BBL AL ANTÍGENO E7**

PRESENTA

L.B.G. NORMA ESTEFANÍA RAMÍREZ ÁVILA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

AGOSTO, 2017

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



TESIS

**EFFECTO ANTITUMORAL DE LA FUSIÓN GÉNICA DEL ADYUVANTE
4-1BBL AL ANTÍGENO E7**

PRESENTA

L.B.G. NORMA ESTEFANÍA RAMÍREZ ÁVILA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

AGOSTO, 2017

"EFECTO ANTITUMORAL DE LA FUSIÓN GÉNICA DEL ADYUVANTE 4-1BBL AL ANTÍGENO E7"

Aprobación de tesis:



Dr. en C. Roberto Montes de Oca Luna
Director



Dra. en C. María de Jesús Loera Arias
Co- Director



Dra. en C. Odila Saucedo Cárdenas
Comisión de tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Monterrey, Nuevo León

Agosto del 2017

“EFECTO ANTITUMORAL DE LA FUSIÓN GÉNICA DEL ADYUVANTE 4-1BBL AL ANTÍGENO E7”

Presentado por

LBG. NORMA ESTEFANÍA RAMÍREZ ÁVILA.

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Celular y Molecular del Departamento de Histología, Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. en C. Roberto Montes de Oca Luna y la Co-dirección de la Dra. en C. María de Jesús Loera Arias.



Dr. en C. Roberto Montes de Oca Luna

Director



Dra. en C. María de Jesús Loera Arias

Co-Director

“El éxito es la suma de pequeños esfuerzos repetidos día tras día”

DEDICATORIA

A mi familia

A mis padres Jesús Salvador Ramírez Gutiérrez y Norma Alicia Ávila Figueroa por siempre impulsarme en superarme tanto personal como profesionalmente, les agradezco por darnos un mejor futuro, aunque eso implicara dejar a sus seres queridos, no imagino lo difícil que debió haber sido, ya que siempre quiero tenerlos a mi lado. ¡Con todo mi amor!

A mis hermanos Laura Natalia, Sandra Lucía y Jesús Salvador porque a pesar de todas nuestras diferencias siempre contaremos los unos con los otros. ¡Con mucho cariño!

A mis abuelitos paternos Jesús Salvador⁺ y María Concepción⁺ y mis abuelitos maternos Juan Manuel e Irene por todo su cariño y apoyo a lo largo de mis estudios.

A mi gran amor

Daniel Matta Yee Chig por estar en todo momento conmigo durante todo este tiempo dándome paz para seguir adelante en mis proyectos y ser incluso hasta parte de ellos. Te agradezco todo el amor que me das cada día con pequeños detalles y por ayudarme a ser una mejor persona. ¡Te amo con todo mi corazón!

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mi comisión de tesis, el Dr. Roberto Montes de Oca Luna por sus enseñanzas, consejos, pero sobre todo por toda su paciencia durante mi estancia y a la Dra. María de Jesús Loera Arias y la Dra. Odila Saucedo por brindarme todo su apoyo, consejos y asesoramiento en mi proyecto. Así como a José Juan y Rodolfo por todos los consejos y ayuda brindada en realizar los experimentos de este proyecto.

A todos mis amigos del laboratorio Abigail, Ana, Sheila, José Juan, David y Daniel quienes hicieron más amenos mis días ahí con todas sus locuras y por compartirme sus experiencias del laboratorio. Así como al personal del Departamento de Histología de la facultad de Medicina UANL, Dra. Raquel, Dr. Arnulfo, Dra. Aracely, Dr. Adolfo, Dr. Humberto, Juany y Alicia.

A mis amigos del corazón Annette, Elda, Bianka y Jorge por brindarme su amistad y estar en todo momento conmigo, por toda su ayuda en mis tiempos de desesperación y angustia, regresándome la armonía para continuar en este trayecto.

Finalmente, a Conacyt por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

RESUMEN

LBG. Norma Estefanía Ramírez Ávila
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de titulación: Agosto 2017

Título del Estudio: EFECTO ANTITUMORAL DE LA FUSIÓN GÉNICA DEL ADYUVANTE
4-1BBL AL ANTÍGENO E7

Páginas del estudio: 61

**Candidato para el grado de Maestra en Ciencias
con Orientación en Morfología**

Área del estudio: Morfología

Propósito y Método del estudio

El cáncer es un problema de salud pública al ser una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Para tratar esta enfermedad se utiliza como Terapia Génica, la administración de genes que codifican AAT, como es el caso del gen E7 del VPH-16, sin embargo, por sí sola resulta ser un pobre inmunógeno haciéndola ineficiente como vacuna terapéutica contra el cáncer. Por lo anterior, se ha utilizado a E7 en conjunto con moléculas coestimuladoras capaces de aumentar la respuesta de células T generadas contra esta oncoproteína, como el ligando 4-1BBL. Este ligando da lugar a una respuesta antitumoral efectiva y específica, que se traduce en la erradicación de tumores establecidos. Sin embargo, debido a que la obtención de estos complejos proteicos es muy laboriosa, se propuso simplificar este sistema, construyendo un gen quimérico que codificara tanto para el adyuvante 4-1BBL como para el antígeno E7 y que éste conserve su efecto antitumoral. Para esto, se comparó el efecto antitumoral de nuestra fusión génica de interés SA/E7/4-1BBL con la fusión génica CRT/E7, la cual había sido previamente utilizada en nuestro grupo de trabajo, en un modelo animal de cáncer cérvico uterino que expresa como antígeno a E7.

Conclusiones y contribuciones

Se logró desarrollar un sistema simplificado de los complejos proteicos basado en la fusión génica del adyuvante SA-4-1BBL al antígeno E7 y con los resultados obtenidos se demostró que nuestra fusión génica SA/E7/4-1BBL es capaz de igualar el efecto antitumoral obtenido en comparación con el sistema de CRT/E7, además dicho efecto es similar al a lo que se ha reportado en diversos artículos que utilizan complejos proteicos. La contribución del presente trabajo representa un gran avance ya que sería más simple su preparación, con la finalidad de que a futuro todo este conocimiento pueda traducirse en una terapia génica antitumoral más eficiente, así como la elaboración de una vacuna terapéutica contra el cáncer cérvico uterino, u otros cánceres que expresen diferentes antígenos.



Dr. en C. Roberto Montes de Oca Luna
Director

CONTENIDO TEMÁTICO

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
CÁNCER CÉRVICO UTERINO.....	3
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH).....	4
ONCOPROTEÍNA E7	6
ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES (AAT)	7
RESPUESTA INMUNE	8
Inmunidad humoral.....	9
Inmunidad celular	10
PROCESAMIENTO DEL VPH POR EL SISTEMA INMUNE	12
MOLÉCULAS COESTIMULADORAS.....	14
INTERACCIÓN DE 4-1BBL CON 4-1BB	15
DESARROLLO DE TERAPIAS CONTRA CÁNCER CÉRVICO UTERINO POR VPH	21
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	23
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25

MATERIALES	26
PLÁSMIDOS	26
CONSTRUCCIONES GÉNICAS	26
BACTERIAS.....	27
LÍNEAS CELULARES	27
MODELO ANIMAL.....	27
ANTICUERPOS.....	28
ENZIMAS.....	28
MEDIOS DE CULTIVO	28
REACTIVOS	28
SOLUCIONES.....	31
CONSUMIBLES.....	32
EQUIPO DE LABORATORIO	33
MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD	35
METODOLOGÍA.....	36
DISEÑO Y CONTRUCCIÓN DE LOS VECTORES.....	36
DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	38
LIGACIÓN DE GENES EN PLÁSMIDOS	38
OBTENCIÓN DE BACTERIAS CALCIO COMPETENTES	38
TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CALCIO COMPETENTES	39

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS.....	39
CULTIVO CELULAR.....	40
WESTERN BLOT.....	40
INMUNOCITOFLUORESCENCIA.....	41
PREPARACIÓN DE BALAS DE ADN.....	41
ENSAYO PROFILÁCTICO.....	42
ENSAYO TERAPÉUTICO.....	42
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
RESULTADOS.....	44
DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS VECTORES PARA LA EXPRESIÓN DEL ADYUVANTE 4-1BBL SOLO Y FUSIONADO AL ANTÍGENO E7.....	44
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA E7 MEDIANTE WESTERN BLOT, ASÍ COMO DE E7 y 4-1BBL MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.....	46
LA FUSIÓN GÉNICA SA/E7/4-1BBL INDUJO PROTECCIÓN CONTRA EL DESARROLLO DE TUMORES QUE EXPRESAN E7.....	49
LA FUSIÓN GÉNICA SA/E7/4-1BBL PRESENTA UN EFECTO ANTITUMORAL EN UN ENSAYO TERAPÉUTICO.....	50
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

4-1BB	Receptor 4-1BB
4-1BBL	Ligando de 4-1BB
%	Por ciento
°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
aa	Aminoácido
AAT	Antígenos asociados a tumor
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
BCR	Receptor de células B
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CaCU	Cáncer cérvico uterino
DC	Célula dendrítica
CO ₂	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígenos
CRT	Calreticulina
DAPI	4',6-DiAmidina-2-FenilIndol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotretaacético
HRP	Peroxidasa de rábano
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
KDa	Kilodalton
LPM	Litros por millón
mA	Miliampere
mg	Miligramo
MHC	Complejo de Histocompatibilidad

Min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro mm ³
mm ³	Milímetro cúbico
ng	Nanogramo
NK	Células asesinas naturales
OD	Densidad óptica
p<	Grado de significancia
pb	Pares de base
PBS	Buffer Fosfato Salino
pH	Potencial de hidrógeno
pRb	Proteína Retinoblastoma
psi	Libra por pulgada cuadrada
PVDF	Polivinilidenofluoruro
PVP	Polivinilpirrolidona
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Estreptavidina
sc	subcutáneo
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Seg	Seg
PS	Péptido señal
TAE	Tris-Acetato-EDTA (Buffer)
TBS	Buffer de Tris Salino
T _H	Linfocito T cooperador
TCR	Receptor de linfocito T
TNF	Factor de necrosis tumoral
UV	Ultravioleta
VPH	Virus del Papiloma Humano
X	Indica concentración/magnificación
V	Volts

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de infección del VPH.	5
Figura 2. Estructura de la oncoproteína E7.	6
Figura 3. Procesamiento de los antígenos del VPH por células presentadoras.	12
Figura 4. Presentación del complejo MHC-I: antígenos a células T CD8 ⁺ .	13
Figura 5. Estructura del 4-1BBL murino.	16
Figura 6. Estructura tridimensional del 4-1BBL.	17
Figura 7. Interacción del 4-1BBL con 4-1BB.	18
Figura 8. Inmunización con el sistema de biobalística.	22
Figura 9. Subclonación del SA/E7/4-1BBL.	37
Figura 10. Obtención de SA/4-1BBL.	37
Figura 11. Diseño del gen SA/E7/4-1BBL.	44
Figura 12. Caracterización de las construcciones.	45
Figura 13. Detección de la expresión de la proteína E7 mediante WB.	46
Figura 14. Detección de la expresión de las proteínas E7 y 4-1BBL mediante inmunofluorescencia.	48
Figura 15. Efecto antitumoral de las fusiones en un ensayo profiláctico.	49
Figura 16. Efecto antitumoral de las fusiones en un ensayo terapéutico.	50
Figura 17. Supervivencia de los ratones inmunizados con las fusiones génicas en un ensayo terapéutico.	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas del VPH.	4
Tabla 2. Uso de antígenos asociados a tumores (AAT).	8
Tabla 3. SA-4-1BBL presenta una mayor respuesta antitumoral.	20

INTRODUCCIÓN

Estudios recientes se han enfocado en el desarrollo de un sistema basado en la fusión génica del adyuvante 4-1BBL al antígeno E7 con resultados muy prometedores.

Se han utilizado antígenos asociados a tumores (AAT) como componentes de vacunas terapéuticas, los cuales, aunque representan un enfoque atractivo para el tratamiento de cáncer aún no se han logrado obtener resultados eficientes debido a su pobre inmunogenicidad y al desarrollo de mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Una alternativa es el uso de adyuvantes que presenten funciones pleiotrópicas en la activación del sistema inmune, como la molécula 4-1BBL, perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF).

Puesto que 4-1BBL en su forma nativa lleva acabo su función como una proteína trimérica ligada a membrana, mostrando una actividad coestimuladora de células T tras su entrecruzamiento con el receptor 4-1BB; se buscó tener un sistema más versátil y fácil de manipular, evitando el contacto célula-célula, lo cual se logró mediante la fusión del dominio extracelular del 4-1BBL murino con el núcleo de la estreptavidina (SA), la cual permite que 4-1BBL exista como un tetrámero soluble, una forma muy semejante a su forma trimérica activa en membrana, lo que resulta en una mayor estimulación del receptor. Posteriormente a SA-4-1BBL se le conjugaron antígenos biotinilados aprovechando la unión no covalente entre la estreptavidina y la biotina para aumentar la respuesta inmune generada por los AAT, demostrando que SA-4-1BBL sirve como vehículo para la entrega de AAT *in vivo* a las células dendríticas (DCs) las cuales expresan constitutivamente el receptor 4-1BB, incrementando así la presentación cruzada de antígenos y las respuestas inmunes generadas por la activación de células T, lo que se traduce en la erradicación de tumores establecidos.

La desventaja de este sistema es que al adyuvante hay que unirlo a la estreptavidina mientras que a los antígenos hay que biotinarlos, por lo cual la estrategia que se propone en este proyecto para simplificar este sistema es utilizar fusiones génicas del 4-1BBL con el antígeno y que en un solo gen se encuentre el antígeno, la estreptavidina y la molécula coestimuladora 4-1BBL para posteriormente evaluar su efecto antitumoral en un modelo de cáncer cérvico uterino que expresa como antígeno la proteína E7 del VPH-16.

En este trabajo se pretende desarrollar un sistema simplificado de los complejos proteicos basado en la fusión génica del adyuvante SA-4-1BBL al antígeno E7, lo cual representa un gran avance ya que sería más simple su preparación, con la finalidad de que a futuro todo este conocimiento pueda traducirse en una terapia génica antitumoral más eficiente, así como la elaboración de una vacuna terapéutica contra el cáncer cérvico uterino, u otros cánceres que expresen diferentes antígenos.

ANTECEDENTES

El cáncer es un problema de salud pública, que consiste en la transformación de células normales en células tumorales debido a carcinógenos físicos, como las radiaciones ionizantes y ultravioleta, carcinógenos químicos, como los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) y el arsénico (contaminante del agua de bebida) y carcinógenos biológicos, como algunos virus, bacterias y parásitos. La OMS estima que para el 2020 habrá 15 millones de nuevos casos reportados.

CÁNCER CÉRVICO UTERINO

El cáncer cérvico uterino (CaCU) es la segunda causa de muerte de mujeres en México (Rudolph et al., 2016). Estudios comparativos de las tasas de mortalidad por esta patología, señalan que las tasas más altas pertenecen a Chile y México, mientras que las más bajas pertenecen a Cuba, Puerto Rico y Argentina (Hidalgo, 2006).

El CaCU se origina en las células del estrato basal del epitelio escamoso estratificado, las cuales se transforman gradualmente en células precancerosas, debido a la proliferación continua e incontrolada de las células, invadiendo tejidos y órganos sanos, hasta su diseminación por todo el cuerpo (Cooper & Hausmam, 2010).

Entre los factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad se encuentran ser mujer de 25-64 años de edad, inicio de relaciones sexuales antes de los 18 años, antecedentes de enfermedad de transmisión sexual, múltiples parejas sexuales, tabaquismo, desnutrición, deficiencias antioxidantes y pacientes con inmunodeficiencias e infección cérvico vaginal por el virus del papiloma humano (Secretaría de Salud, 2006).

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH)

El VPH es el principal factor etiológico del CaCU en el 99.7% de los casos detectados y además en base a su potencial oncogénico, la mayoría de los tipos VPH se clasifican de acuerdo con su riesgo de causar CaCU en dos categorías: de alto y bajo riesgo. Los tipos de alto riesgo del VPH incluyen el 16, 18, 31, 33, 35, 45 y 58, los cuales se integran en el genoma celular, originando tumores malignos; mientras que los tipos de bajo riesgo del VPH que incluyen el 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81, se encuentran en estado episomal, originando tumores benignos (Ortega et al., 2016). No obstante, en algunas ocasiones estas lesiones progresan y se convierten en tumores malignos diseminándose a las áreas cercanas. Se estima que en el CaCU el 60% de los casos son causados por el genotipo VPH-16 y en el 10% de los casos son causados por el genotipo VPH-18 (Ortega et al., 2016; Rudolph et al., 2016). La población femenina originaria de Latinoamérica es considerada como de alto riesgo para desarrollar CaCu, en donde cada año se reportan 68,000 casos nuevos (Hidalgo, 2006).

Tabla 1. Proteínas del VPH. Se muestra el papel que juegan las diferentes proteínas relacionadas al VPH.

Gen	Función
E1	Proteína que participa en el inicio de la replicación y transcripción del ADN viral
E2	Proteína que regula la transcripción y auxilia la replicación del ADN viral
E4	Proteína que rompe la citoqueratina de la célula
E5	Proteína de transformación de membrana, interactúa con receptores de crecimiento
E6	Proteína de transformación que degrada a p53
E7	Proteína de transformación que se une a Rb
L1	Proteína de la cápside mayor
L2	Proteína de la cápside menor

El genoma del VPH se encuentra organizado en ocho principales genes que están codificados en una sola cadena de ADN viral, los cuales se encuentran clasificados como tempranos y tardíos.

Los genes tempranos como E1, E2, E4, E5, E6 y E7 codifican para proteínas involucradas en la replicación, transcripción viral y transformación celular; mientras que los genes tardíos como L1 y L2 codifican para proteínas de la cápside (tabla 1) (Velásquez & Jiménez, 2016).

La infección del VPH ocurre a través de lesiones producidas en el epitelio dejando expuestas las células de la lámina basal a la penetración del virus, conduciendo al establecimiento y replicación del genoma viral, produciendo de 20 a 100 copias extra cromosómicas de ADN del VPH por cada célula de la lámina basal y una vez ensamblado, el virión será liberado cuando la célula llegue a las capas superiores del epitelio, infectando así a otras células (figura 1) (Velásquez & Jiménez, 2016).

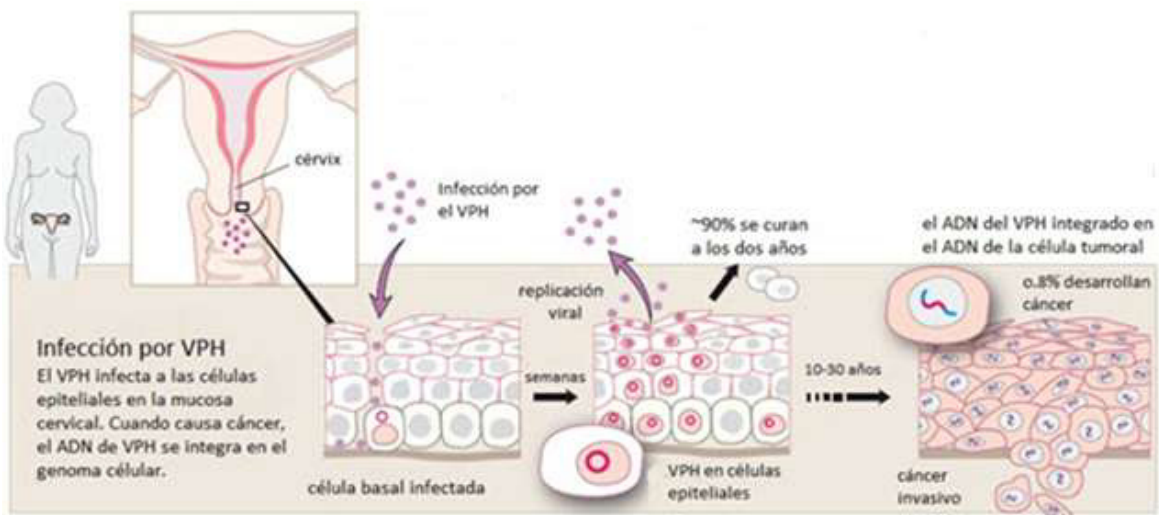


Figura 1. Mecanismo de infección del VPH. Se muestra el mecanismo de infección y reproducción del VPH (Imagen tomada del Centro de ADN, BIOSYNADN).

ONCOPROTEÍNA E7

El gen E7, de aproximadamente 300 a 320 pb, codifica una proteína nuclear de 98 aa que presenta 3 dominios: CD1 el cual se encuentra en el extremo amino terminal, CD2 el cual contiene un motivo LXCXE donde se une la proteína Rb alterando su función y CD3 el cual se encuentra en su extremo carboxilo terminal que posee un sitio con motivos de dedos de zinc que se utiliza para su dimerización (figura 2) (Liu et al., 2006).

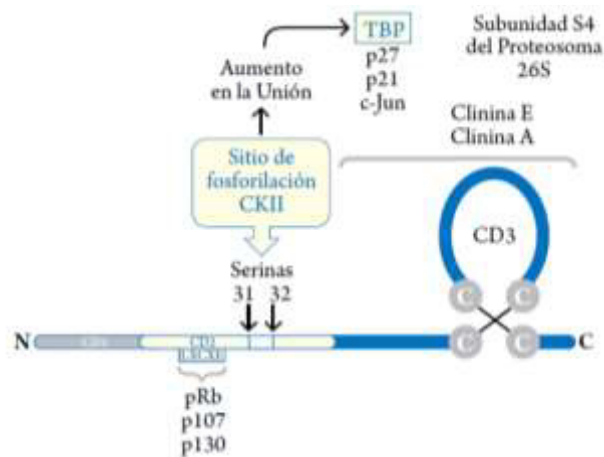


Figura 2. Estructura de la oncoproteína E7. Se muestran los 3 dominios de E7 (CD1, CD2 y CD3). El sitio de unión al pRb y el dedo de zinc son los responsables de su capacidad de transformación (Imagen tomada de De la Cruz y Lizano, 2004).

En células normales la proteína Rb se encuentra formando complejos con factores de transcripción de la familia E2F reprimiendo la transcripción de genes involucrados en la progresión hacia la fase S, sin embargo, cuando Rb es fosforilado por cinasas dependientes de ciclinas, se libera del factor de transcripción E2F y de esta forma se activan genes involucrados en la replicación y permite la progresión del ciclo celular. Cuando la proteína E7 del VPH-16 se encuentra presente en la célula, ésta secuestra a Rb evitando que forme complejos con E2F, induciendo de esta manera a las células a entrar prematuramente a la fase S; de esta manera E7 desregula el ciclo celular y conduce al incremento de la proliferación, immortalización y finalmente la transformación celular (Chakrabarti & Krishna, 2003).

ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES (AAT)

Actualmente se sabe que existen moléculas que son expresadas en las células cancerígenas de forma selectiva, aberrante o en cantidades muy superiores en relación con las células normales y que muchas de estas moléculas tienen capacidad inmunogénica, convirtiéndose en interesantes blancos inmunológicos capaces de generar una respuesta que permita la eliminación del tumor. Estos antígenos, denominados comúnmente Antígenos Asociados a Tumores (AAT), tienen en la mayoría de los casos actividades biológicas relacionadas con la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, adherencia de las células tumorales y metástasis, por lo que una respuesta inmunológica dirigida contra ellos podría generar la destrucción tumoral o tener un efecto inhibitorio de su actividad mediante el bloqueo por anticuerpos de sitios biológicamente activos.

Muchos de estos antígenos han sido descubiertos gracias a la presencia espontánea de anticuerpos en pacientes con tumores que los expresan, indicando que han dejado de ser reconocidos como propios, por ser lo suficientemente diferentes antigénicamente, porque se expresan en cantidades significativamente mayores en las células tumorales o porque están ausentes en los tejidos normales (Sarmiento, 2015). Existen una gran cantidad de AAT que han sido catalogados como marcadores específicos para diferentes tipos de cáncer (tabla 2), debido a que estos son reconocidos y procesados por el sistema inmune (Novellino, Castelli & Parmiani, 2005).

El primer estudio en el que se encontró evidencia de que el antígeno E7 del VPH-16 inducía el rechazo de tumores fue una investigación en la que se trasplantaron fibroblastos que expresaban el gen E7 a murinos sirviendo como vacuna capaz de conferir protección ante un implante con células de melanoma que expresaban E7 (Chen et al., 1991).

Debido a que diversos estudios demuestran que la oncoproteína E7 juega un rol importante en la transformación y el mantenimiento del fenotipo maligno de las células, que es de expresión

continua en células tumorales por VPH y que la inmunización con éste es capaz de generar respuestas inmunes específicas a antígeno, es catalogado como un AAT ideal para el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer asociado al VPH (Yang et al., 2014). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios sobre los AAT que demuestran ser una promesa en la obtención de efectos antitumorales en modelos animales, estos éxitos todavía tienen que ser replicados en los seres humanos debido a la inmunogenicidad ineficiente y tolerancia inmune inherente (Yang et al., 2014).

Tabla 2. Uso de antígenos asociados a tumores (AAT). Se muestra diferentes AAT utilizados para diferentes tipos de cáncer en ensayos clínicos, en donde se puede observar para el CaCU se utiliza E7.

Enfermedad	Antígenos	Diseño	Fase	Resultados
Melanoma	Gp 100	gp100 del ratón xenogénico o gp100 humana. gp100 xenogénico entregado por PMED	I I	Incremento de IFN γ +, producción de células T CD8+, ausencia de toxicidad.
Cáncer de mama	HER2	Longitud de señalización deficiente del gen completo HER2 con dosis bajas de IL-2 y GM-CSF.	I	Respuesta de anticuerpos a largo plazo, ausencia de toxicidad.
	Mam-A	HER2 quimérico de rata/humana dirigida a las células dendríticas. Vacuna codificando el cDNA de Mam-A.	I	INFPy+ en la producción de células T CD8+ y CD4+ Expresión de INFPy+ en la expansión de células T CD4+, decremento de células T reguladoras
Cáncer colorectal	CEA	CEA humano modificado fusionado a epitopo T cooperador del toxoide tetánico con ciclofosfamida y GM-CSF.	I	Ausencia de toxicidad.
Cáncer de próstata	PAP	PAP con adyuvante GM-CSF.	I/II	Expresión de INFPy+ en células T CD8+, proliferación de células T CD8+ y CD4+, incremento de la respuesta inmune
	PSMA	ADN que codifica un epitopo de tumor derivado de PSMA fusionado a un dominio de fragmento C de la toxina tetánica.	I/II	Inducción de células T CD4+, producción de anticuerpos, desarrollo de células T CD8+
Cáncer cervical	E7/E6 VPH	DNA que codifica a E7 modificado del VPH incapaz de unirse a la proteína retinoblastoma fusionado con HSP70 y una secuencia señal de secreción. E6 y E7 del VPH-16 y 18 altamente optimizado E6 y E7 del VPH.	I	Ausencia de toxicidad
			I I	Respuesta de células T CD8+, ausencia de toxicidad Respuesta de células T CD8+

RESPUESTA INMUNE

La función del sistema inmunitario consiste en proteger a los organismos de agentes patógenos mediante dos sistemas de inmunidad: innata y adaptativa. La inmunidad innata consta de barreras físicas (como la piel y la membrana mucosa, permitiendo aislar el interior del cuerpo contra patógenos del mundo exterior), químicas (como la acidez del contenido estomacal y moléculas

solubles especializadas con actividad antimicrobiana) y líneas celulares (como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales) que detectan agentes extraños e instigan un contra ataque mediante la fagocitosis del mismo o su destrucción por acción de proteínas catalíticas secretadas por las células. Sin embargo, es posible que algunos patógenos logren evadir el sistema innato, por lo que existe un segundo sistema llamado inmunidad adaptativa, que es inducido por la exposición a microorganismos y combate la infección de manera específica del antígeno, ya sea mediante inmunidad humoral mediada por linfocitos B, o inmunidad celular mediada por linfocitos T (Kindt, Goldsby & Osborne, 2007).

Inmunidad humoral

En la respuesta inmune humoral participan los linfocitos B, los cuales presentan un receptor de células B (BCR) y un anticuerpo que es específico para el epítipo o motivo de antígenos (Stanley, 2006). Se encuentran dos tipos de subconjuntos, los linfocitos B que reconocen antígenos dependientes del timo, los cuales necesitan el contacto directo de las células T_H , o los linfocitos B que reconocen antígenos independientes del timo, los cuales no necesitan la participación directa de las células T_H . En ésta última es necesaria la participación de las células T_{H2} , para la maduración de los linfocitos B en células plasmáticas que son capaces de secretar grandes cantidades de anticuerpos IgM, generando de esta manera la respuesta primaria; así como para generar células B de memoria, las cuales reconocerán antígenos previos, produciendo el cambio del isotipo de los anticuerpos a IgG que se unirán con mayor afinidad a los antígenos diana, generando de esta manera la respuesta secundaria (Abbas, Lichtman & Pillai, 2008).

Inmunidad celular

Por otro lado, en la respuesta inmune celular se encuentran dos subconjuntos principales de células T, las CD4+ y CD8+ que muestran restricción al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II y I respectivamente, los cuales tienen como función el reconocimiento de los antígenos propios y no propios para la generación de la respuesta inmune. La molécula MHC-I, expresada en todas las células nucleadas, contiene una cadena α organizada en 3 dominios externos (α -1, α -2 y α -3) vinculada de manera no covalente con una molécula de microglobulina β_2 ; entre los dominios α -1 y α -2 se encuentra la hendidura de unión del péptido antigénico (8-9 aminoácidos), mientras que el dominio α -3 corresponde a la fracción transmembrana que ancla la cadena α en la membrana celular. El MHC-I es sintetizado en el retículo endoplásmico (RE) y requiere de la adición del epítipo durante su plegamiento para que sea estabilizado y enviado hacia la superficie celular, cabe resaltar que los epítopos presentados por el MHC-I son producto de la degradación de proteínas por el proteosoma incluyendo aquellos derivados de la degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) y de los productos ribosomales defectuosos (DRiPS). La molécula MHC-II, expresada únicamente en las células presentadoras de antígenos, contienen dos cadenas α y β vinculadas de manera no covalente, donde cada una contiene dos dominios (α -1, α -2, β -1 y β -2); entre los dominios α -1 y β -1 se encuentra la hendidura de unión del péptido antigénico (9-12 aminoácidos), mientras que α -2 y β -2 corresponden a la fracción transmembrana que las anclan en la membrana celular. El MHC-II es sintetizado en el RE, requiere la adición de un péptido denominado cadena invariable (CLIP) para que sea estabilizada y así promover su salida del RE para ubicarla en la cara interna de las membranas del endosoma, donde se fusionará con un fagosoma que hidrolice su contenido y los pequeños péptidos generados sustituyan las cadenas CLIP para posteriormente ser enviados a la superficie celular (Abbas, Lichtman & Pillai, 2008).

Posteriormente se procede al procesamiento de los antígenos mediante la activación de células T, las cuales necesitan de dos señales: la primera señal consiste en la unión del receptor de las células T (TCR) con un péptido antigénico procesado unido a una molécula MHC-I (células CD8+) o MHC-II (células CD4+) en la superficie de la célula presentadora de antígeno y una segunda señal de coestimulación inducida por la interacción CD28-B7, estimulando de esta manera la liberación de la interleucina IL-2, provocando la diferenciación y proliferación de células T de memoria o efectoras (Abbas, Lichtman & Pillai, 2008).

Las células de memoria, una vez que son activadas nuevamente por el patógeno específico, al cual son afines, inducen respuestas más rápidas y más potentes. Por otro lado, las células T efectoras CD4+ producen la secreción de una variedad de proteínas pequeñas (citocinas) que ayudan y regulan funciones de otras células, donde según el patrón de expresión de citocinas se define los dos subconjuntos principales de células T CD4+ conocidas como células T_H2 o T_H1.

- Las células T_H1 secretan IL-2, IFN- γ y TNF- β creando un ambiente proinflamatorio en el que se activan los efectores citotóxicos claves como macrófagos, células asesinas naturales y linfocitos T CD8+ citotóxicos, generando inmunidad mediada por células.
- Las células T_H2 secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, generando un ambiente antiinflamatorio además de ayudar a los linfocitos B a diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos para generar inmunidad humoral.

También se encuentra otro grupo de células T con función reguladora (Tregs) caracterizadas por el fenotipo CD4+CD25+ Foxp3+ y la secreción de IL-10 y TGF- β . Se cree que las células con este fenotipo reconocen auto-antígenos y funcionan para prevenir la autoinmunidad, sin embargo, también regulan las respuestas a los antígenos exógenos, así como en infecciones virales y crónicas (Abbas, Lichtman & Pillai, 2008).

PROCESAMIENTO DEL VPH POR EL SISTEMA INMUNE

Cuando el genoma del VPH ingresa en células presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos, etc.), éste se transloca al núcleo donde se inicia la transcripción del ARNm; a continuación, los transcritos se llevan al citoplasma y allí se traducen a proteínas. Debido a mecanismos de homeostasis intracelular e inmunovigilancia, algunas de las proteínas recién sintetizadas son degradadas por el proteosoma hasta péptidos de 8-10 aminoácidos que se transportan al RE mediante un sistema especializado que utiliza proteínas transportadoras (TAP-I y TAP-II), donde posteriormente pueden ser recortados por aminopeptidasas tales como ERAP1 y ERAP2. A continuación estos péptidos (en los que van incluidos epítopos de antígenos del VPH) se unen al complejo MHC clase I con ayuda del complejo de carga de péptidos (PLC) compuesta por TAP, tapasina, ERp57 y calreticulina (figura 3), estabilizando la molécula para su migración a la superficie celular (Mota, 2009; Vigneron, 2015).

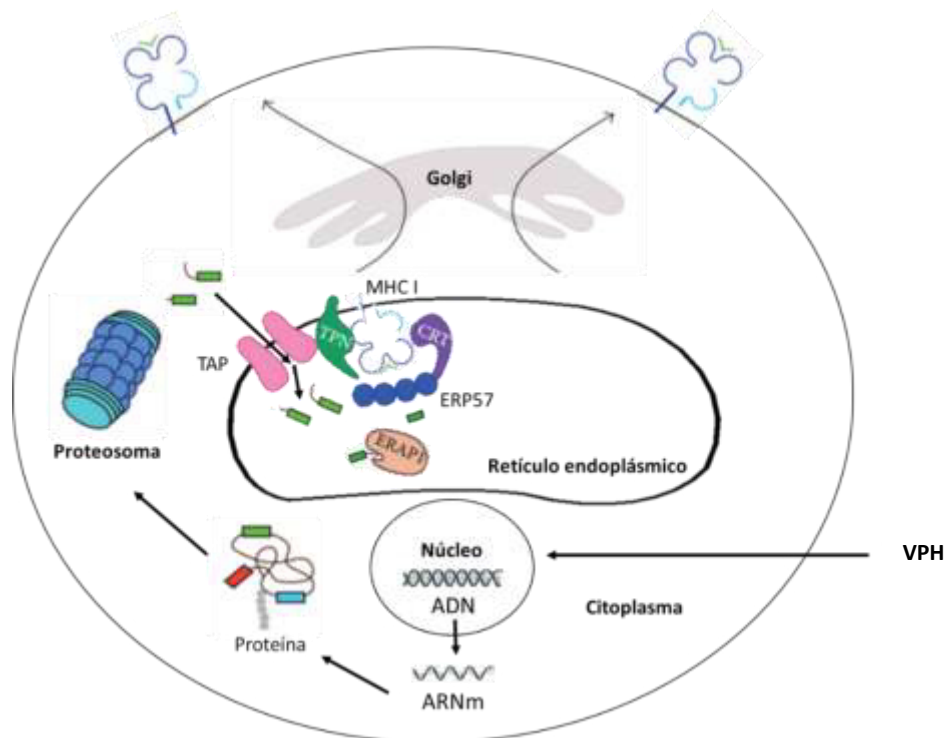


Figura 3. Procesamiento de los antígenos del VPH por células presentadoras. Se muestra como los antígenos son degradados y entran al retículo endoplásmico para ser cargados al MHC-I.

Una vez que está en la superficie celular el complejo MHC: Ag, éste es reconocido por el receptor presente en los linfocitos T citotóxicos (CD8+), los cuales son activados promoviendo su proliferación y acción efectora. Así mismo es necesaria la unión de moléculas coestimuladoras principalmente de las superfamilias CD28 y TNF (Sharma, Yolcu, & Shirwan, 2014), culminando en la generación de respuestas inmunes efectivas como el liberar granzimas y perforinas por parte de las células T para inducir la apoptosis en las células infectadas por VPH (figura 4) y de esta manera eliminarlas y con ello prevenir el desarrollo de tumores (Cooper & Hausman, 2010).

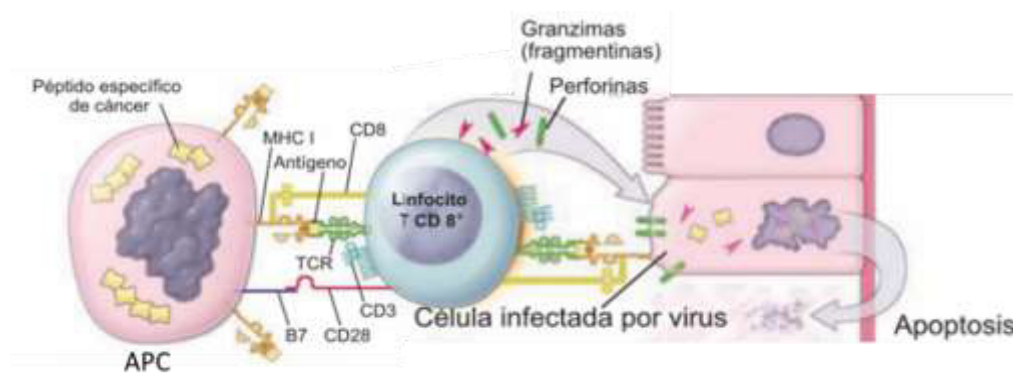


Figura 4. Presentación del complejo MHC-I: antígenos a células T CD8+. Se muestra como los linfocitos T CD8+ reconocen el complejo MHC:Ag cargado en las células presentadoras de antígenos (CPA), liberando granzimas y perforinas para inducir apoptosis en las células infectadas (Imagen tomada de Wojciech, 2015) .

Sin embargo, aun y cuando la oncoproteína E7 induce respuestas inmunes celulares y humorales y es de fácil producción biotecnológica, por si sola es un pobre inmunógeno haciéndola ineficiente como vacuna terapéutica de cáncer (Sharma et al., 2010). Por lo anterior, se ha utilizado a E7 en conjunto con moléculas coestimuladoras o adyuvantes con funciones pleiotrópicas para aumentar la respuesta de células T generadas contra esta oncoproteína (Sharma, Yolcu & Shirwan, 2014).

MOLÉCULAS COESTIMULADORAS

Las moléculas coestimuladoras participan en el desarrollo, proliferación, diferenciación, supervivencia y homeostasis del sistema inmune, por lo que éstas pueden apoyar en el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer. Dichas moléculas se encuentran divididas en 4 superfamilias que incluyen CD28, TNF, integrinas/moléculas de adhesión y del dominio de la mucina/ Ig de la célula T, dentro de las cuales destacan los miembros de las superfamilias CD28 y TNF que son de gran importancia en las respuestas primarias y de largo plazo de las células T (Sharma, Yolcu & Shirwan, 2014).

Entre los miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) que desempeñan papeles importantes en la inmunidad adaptativa se incluyen (pero no se limitan) los receptores 4-1BB (CD137), OX-40, CD27, CD70, GITRL, CD30L y LIGHT. Estos receptores son expresados de manera constitutiva en células T activadas y la unión con sus ligandos proporcionan una oportunidad única para expandir las respuestas inmunes específicas en curso, evitando así las respuestas inmunes no específicas (Kober et al., 2008).

El ligando 4-1BBL es el miembro más eficaz, de la familia de los ligandos del TNF, en estimular a linfocitos T (Kober et al., 2008), al unirse a su receptor 4-1BB ocasionando efectos pleiotrópicos en células del sistema inmune innato (Futagawa et al., 2002; Wilcox et al., 2002), adaptativo (Myers et al., 2006) y regulatorio (Robertson et al., 2008). Por lo tanto esta interacción presenta una gran oportunidad para diseñar vacunas que sean capaces de activar la función citotóxica de las células T CD8+ (Shuford et al., 1997; Wilcox et al., 2004). De hecho, esta vía ha sido ampliamente estudiada en la inmunoterapia contra el cáncer en diversos modelos animales con una eficacia terapéutica demostrada y actualmente se está llevando a cabo en ensayos clínicos (Sharma, Yolcu & Shirwan, 2014).

INTERACCIÓN DE 4-1BBL CON 4-1BB

La identificación del receptor de 4-1BB inició a partir del estudio de linfocitos T citotóxicos aislados previamente en un procedimiento de detección diferencial (Kwon et al., 1987), este receptor consiste de un polipéptido de 256 aminoácidos y se descubrió en linfocitos T CD8+ estimulados con Concanalina A o antígenos (Kwon & Weissman, 1989). Además, mediante el análisis de su secuencia génica se determinó que era miembro de la familia del factor de necrosis tumoral, los cuales son receptores unidos a membrana, que se encuentran como trímeros en su forma activa y participan en la activación de células T (Smith et al., 1990). Este receptor se expresa de manera inducible en células natural killer (NK), monocitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos (Melero et al., 2008) y de manera constitutiva en células T y células dendríticas (DC) (Futagawa et al., 2002) y al activarse incrementa la supervivencia de la célula, la secreción de citocinas como IL-6 e IL-12 y además incrementa la resistencia a la supresión por células T reguladoras (Sharma et al., 2009).

Más tarde, con el propósito de identificar el ligando del receptor 4-1BB, se usó como sonda una forma soluble de 4-1BB fusionado a la región Fc de una IgG marcada radiactivamente, demostrando que el ligando era una proteína de membrana a la que se le llamó 4-1BBL. Además se encontró que la interacción actúa como una señal coestimuladora para inducir la proliferación de células T en presencia de PHA (Goodwin et al., 1993). Este ligando se expresa en varias células presentadoras de antígenos tales como células B, monocitos, macrófagos y células dendríticas, así como linfocitos T (Melero et al., 2008; Rabu et al., 2005; Futagawa et al., 2002) y presenta un solo marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido de 309 aminoácidos (figura 5) compuesto por un dominio citoplasmático en su extremo amino, seguido de un dominio transmembrana (83-103) y finalmente un dominio extracelular (106-309) en su extremo carboxilo (Goodwin et al., 1993).

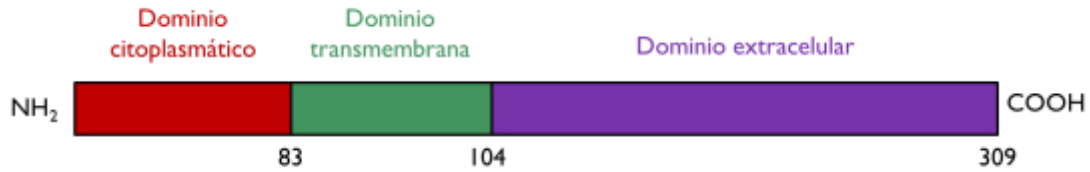


Figura 5. Estructura del 4-1BBL murino. Se muestran los 3 dominios que componen la proteína del 4-1BBL.

La ausencia de una secuencia señal y la presencia de un dominio hidrofóbico sugirió que 4-1BBL era una proteína de membrana tipo II, es decir, su N-terminal es intracelular. Así mismo se identificó que la localización cromosómica de 4-1BB se encuentra en el cromosoma 4 en ratón y en el cromosoma 1p36.2 en humanos, mientras que el 4-1BBL se encontró en el cromosoma 17 en ratón y en el cromosoma 19p13.3 en humanos (Alderson et al., 1994; Goodwin et al., 1993).

Posteriormente, en células humanas se identificó que el gen del receptor codifica para una proteína de 255 aminoácidos y presenta un 60% de identidad con la de ratón, mientras que para el ligando codifica para una proteína de 254 aminoácidos y presenta un 36% de identidad con la de ratón (Alderson et al., 1994).

Los análisis bioinformáticos mostraron una similitud del extremo C-terminal del dominio extracelular con otros miembros de la familia del TNF (Goodwin et al., 1993), los cuales existen en su forma biológicamente activa como trímeros unidos a la membrana (Gruss & Dower, 1995), sin embargo, no había estudios de la estructura ni de la organización de 4-1BBL que lo confirmara. Fue hasta el 2005 que se decidió generar una forma soluble de 4-1BBL para determinar su estructura y su unión a 4-1BB, la cual contenía todo el dominio extracelular del 4-1BBL humano acoplado a un péptido llamado AviTag, el cual existe como un homotrímero. Esta construcción presenta una cola larga de 43 aminoácidos que abarca desde la membrana hasta el dominio homólogo del TNF (THD), la cual se encuentra ausente en el péptido FLAG-4-1BBL, el cual existe como monómero. Con esto

se desarrolló un modelo tridimensional de la estructura de 4-1BBL observando que en forma de tetrámeros y trímeros se permite una eficiente coestimulación de la proliferación de linfocitos T (Rabu et al., 2005).

La estructura tridimensional de 4-1BBL se encuentra formada por dos hojas apiladas, cada una compuesta de cinco hebras anti-paralelas que adoptan la clásica topología "jelly-roll" encontrada en las proteínas pertenecientes a la familia TNF (figura 6). Las hojas internas formada por las cadenas A, A', H, C y F se encuentran envueltas en el contacto del trímero, así como una hoja externa formada por las cadenas B, B', D, E y G, y un largo bucle A'B'. En la estructura activa de 4-1BBL como trímero las 3 hélices aplanadas se encuentran estabilizadas por aminoácidos hidrofóbicos como: Gln89, Leu115, His205, Val140, Phe199, Val240, Pro242 y Pro245 (Won et al., 2010).

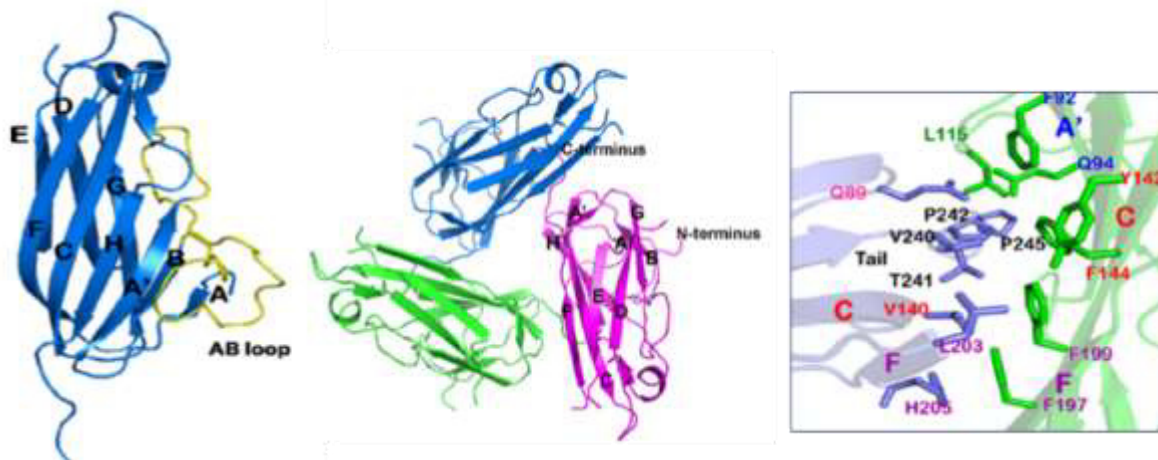


Figura 6. Estructura tridimensional del 4-1BBL. Se muestra la estructura del ligando, la cual se encuentra como trímero en su forma activa y los aminoácidos implicados en estabilizar su estructura (Imagen tomada de Wong, 2010).

La unión de 4-1BBL a 4-1BB tiene una apariencia similar a un molino de viento (figura 7) y ésta unión se da principalmente por 3 residuos en el dominio extracelular de 4-1BBL que se encuentran en proximidad con el receptor 4-1BB como: Lys127, Gln227 y Leu115 (Won et al., 2010).

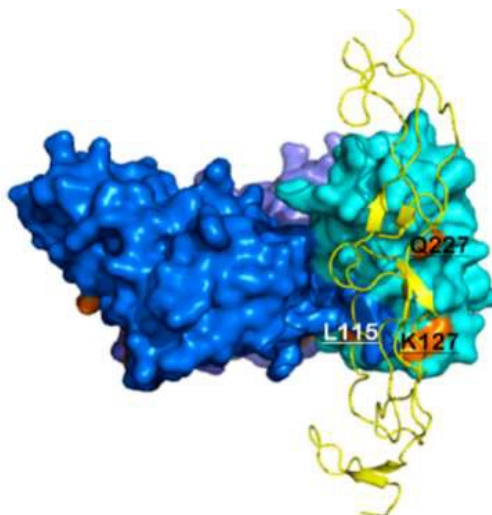


Figura 7. Interacción del 4-1BBL con 4-1BB. Se muestran los aminoácidos implicados en la interacción del ligando con su receptor (Imagen tomada de Wong, 2010).

Dicha interacción de 4-1BBL/4-1BB promueve la producción de citosinas tipo 1, tales como IL-2, IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-12, sugiriendo que 4-1BB puede ser específico para células T efectoras tipo 1, que son críticas para erradicar infecciones crónicas y células malignas (Sharma, Yolcu, & Shirwan, 2014).

En un principio se utilizó la administración de anticuerpos monoclonales, los cuales pueden actuar como ligandos agonistas proporcionando señales que imiten a aquellas recibidas por los ligandos coestimuladores naturales para receptores en varias terapias contra diversos virus y cáncer (Alfaro et al., 2006). El desarrollo de anti-4-1BB generó potentes respuestas inmunes antitumorales que se tradujeron en la erradicación de tumores en diversos modelos preclínicos, incluyendo carcinoma de colon, linfomas, sarcoma Ag104A y mastocitoma P815 sin necesidad de un contacto célula a célula para suministrar la señal de coestímulo. En los ratones que se les indujo mastocitoma P815, mostraron memoria inmune a largo plazo al ser nuevamente desafiados y al analizar los esplenocitos se observó la activación y expansión clonal de las células T CD8+ antígeno específicas (Melero et al., 1997; Melero et al., 1998). Los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales fueron más efectivos que los ligandos naturales de 4-1BB debido a que los tumores que se escapaban al rechazo

mostraron tendencia a haber perdido la expresión del 4-1BBL, proporcionando evidencia evolutiva de una presión selectiva ejercida por el sistema inmunitario en contra de la expresión de esta molécula de coestímulo (Alfaro et al., 2006; Guinn et al., 1999). Por lo que era muy dudoso que la transfección de células tumorales con el 4-1BBL presentara una aplicación exitosa en la clínica.

Sin embargo, un efecto adverso muy común en la terapia con anticuerpos agonistas para miembros de las familias CD28 y del Factor de Necrosis Tumoral es la toxicidad sistémica, lo cual fue un hallazgo desalentador (Schabowsky et al., 2009). Un ejemplo de esto fue un ensayo clínico Fase 1 en el cual una sola dosis de anticuerpo monoclonal anti-CD28 por vía intravenosa llevó a falla multi orgánica y una respuesta inflamatoria sistémica (Suntharalingam et al., 2006). Por consiguiente, fue necesario buscar estrategias que pudieran vencer la evasión al sistema inmune de parte del tumor sin causar efecto adverso alguno y aumentar la tasa de éxito en la clínica (Sharma et al., 2010).

Por lo que como alternativa se generó una forma quimérica de 4-1BBL, en la que utilizaron el dominio extracelular de 4-1BBL que es requerido para la unión y la traducción de señales a través del receptor 4-1BB y lo fusionaron con el núcleo de la estreptavidina (SA) que debido a sus propiedades permite que 4-1BBL exista como un tetrámero, una forma muy similar a su forma activa, con la propiedad de inducir la proliferación de células T CD8+ y CD4+, así como una rápida expansión y supervivencia de células Treg, las cuales demostraron su potente actividad supresora por la inhibición en la respuesta proliferativa de células T (Elpek et al., 2007; Schabowsky et al., 2009).

Tabla 3. SA-4-1BBL presenta una mayor respuesta antitumoral. Se muestra una comparación de la respuesta antitumoral de SA-4-1BBL y anti-4-1BB, siendo más eficiente la de SA-4-1BBL.

Respuesta antitumoral	SA-4-1BBL	Anti-4-1BB
Generación de respuesta primaria de células T	++	+
Proliferación de células T CD8+	++	+
Proliferación de células T CD4+	++	+
Inhibición de la conversión de las células T efectoras a células T reguladoras CD4+CD25+FoxP3+	++	+
Erradicación de tumores	++	+

En otro experimento utilizaron complejos proteicos, en los que se conjugaron antígenos biotinilados a la molécula quimérica SA-4-1BBL, aprovechando la unión no covalente entre la estreptavidina y la biotina. Se demostró que estos complejos proteicos servían como un vehículo para la entrega de antígenos biotinilados a DCs, mejorando la captación y presentación cruzada de los antígenos por parte de DCs y por consiguiente respuestas inmunes efectivas por el aumento de células T CD8+, que permitieron la supervivencia del 70% en los ratones que fueron inmunizados con estos complejos proteicos durante los 90 días del estudio (Sharma et al., 2010; Sharma et al., 2010), dando como resultado una mejor eficacia terapéutica que las formulaciones de vacunas que contenían agonistas de TLR, LPS, MPL, CpG o el mAb agonista 4-1BB (Sharma et al., 2009).

Por lo tanto, la estimulación del receptor con los complejos proteicos genera respuestas inmunes más efectivas en la proliferación de células T CD8+ principalmente, células T CD4+, inhibición de la supresión de células T reguladoras y establecimiento de memoria a largo plazo, así como incremento de la captación y presentación cruzada de antígenos en comparación con los resultados obtenidos por la estimulación de 4-1BB con anticuerpos monoclonales (tabla 3). Estas formulaciones de vacunas que emplean SA-4-1BBL como adyuvantes, no sólo regulan la función de las DC, las células T y otras células críticas de la inmunidad innata, adaptativa y reguladora, sino que también sirven

como vehículos para suministrar AAT a DCs *in vivo* sin toxicidad detectable, son de gran utilidad con potencial éxito en la clínica para el desarrollo de vacunas terapéuticas contra cáncer e infecciones crónicas (Sharma, Yolcu & Shirwan, 2014).

DESARROLLO DE TERAPIAS CONTRA CÁNCER CÉRVICO UTERINO POR VPH

Se han desarrollado diferentes métodos físicos y químicos de tratamiento, entre estos podemos mencionar a la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la crioterapia con sus respectivas variantes o adaptaciones (Sellors et al., 2003). En la mayoría de los casos estos tratamientos provocan una serie de reacciones secundarias peligrosas que dañan al paciente y aunado a esto, en un buen porcentaje de los casos no se logra resolver el problema y las pacientes recaen.

Debido a las deficiencias de las terapias existentes para combatir el CaCu, en la actualidad se ha optado por recurrir a una nueva generación de tratamientos basados en el uso de Terapia Génica (Jinoch et al., 2003). Dentro de estas terapias se encuentra el uso de fragmentos de ADN desnudo, proteínas y péptidos como antígenos y el uso de moléculas estimuladoras del sistema inmune. Otros trabajos se han enfocado en la búsqueda de estrategias para la administración efectiva de dichas moléculas en el interior de los tejidos afectados; ya que al administrar péptidos o proteínas como antígenos, estos son rápidamente degradados e inducen tolerancia. Entre estas estrategias destacan el uso de bacterias y virus como vectores para transferir el ADN a las células diana.

En este trabajo se propone simplificar el sistema de los complejos proteicos mediante la fusión génica del adyuvante 4-1BBL al antígeno E7, que será utilizado como vacuna de ADN con ayuda del sistema de biobalística (Bio-Rad Helios Gen- Gun), el cual ya ha sido estandarizado con éxito para la expresión de genes reporteros y terapéuticos, como método de inmunización en un modelo terapéutico de cáncer cérvico uterino (figura 8).



Figura 8. Inmunización con el sistema de biobalística. Se muestra la expresión del gen reportero LacZ en la piel de ratones inmunizados con el sistema Helios GeneGun, las muestras fueron obtenidas durante el proceso de estandarización de la técnica en nuestro laboratorio. 200X (Imagen tomada de Pérez, 2016).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Será posible simplificar este sistema de complejos proteicos en un solo gen y mantener su efecto antitumoral?

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema de salud pública al ser una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Para tratar esta enfermedad se utilizan terapias antitumorales convencionales entre las que destacan la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, sin embargo, éstas provocan una serie de peligrosas reacciones secundarias que dañan al paciente y, aunado a esto, un buen porcentaje de los casos no se logran resolver y los pacientes recaen. Una estrategia más reciente es el uso de la Terapia Génica, administrando genes que codifican AAT, como es el caso de la inducción de inmunidad administrando el gen E7 del VPH-16; aun y cuando la oncoproteína E7 induce respuestas inmunes celulares y humorales, por si sola es un pobre inmunógeno haciéndola ineficiente como vacuna terapéutica de cáncer. Por lo anterior, se ha utilizado a E7 en conjunto con moléculas coestimuladoras o adyuvantes con funciones pleiotrópicas para aumentar la respuesta de células T generadas contra esta oncoproteína como el ligando 4-1BBL.

Se ha demostrado que 4-1BBL formando complejos con E7, presenta efectos pleiotrópicos sobre una amplia gama de células inmunitarias, dando lugar a una respuesta antitumoral efectiva y específica. Sin embargo, debido a que la obtención de estos complejos proteicos es muy laboriosa, se propone simplificar este sistema, construyendo un gen quimérico que codifique tanto para el adyuvante 4-1BBL como para el antígeno E7 y que conserve su efecto antitumoral.

HIPÓTESIS

El adyuvante 4-1BBL fusionado al antígeno E7 en un solo gen posee efecto antitumoral.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar si la fusión génica del adyuvante SA-4-1BBL al antígeno E7 del VPH-16 presenta un efecto antitumoral.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar y construir vectores para la expresión del adyuvante SA-4-1BBL solo y fusionado al antígeno E7 del VPH-16.
2. Demostrar si las fusiones génicas expresan las proteínas correspondientes.
3. Demostrar si la administración de la fusión génica SA-4-1BBL/E7 induce protección contra el desarrollo de tumores que expresan E7 del VPH-16.
4. Demostrar si la administración de la fusión génica de SA-4-1BBL/E7 presenta un efecto antitumoral en un ensayo terapéutico.

MATERIALES

PLÁSMIDOS

- PUC57: vector de clonación de 2710 pb, presenta un promotor LacZ para la expresión constitutiva en células eucariotas y el gen de resistencia a ampicilina para la selección de clonas recombinantes y generar delecciones *ExoIII* (GenScript).
- pUMVC4a: vector de clonación de 4479 bp, presenta un promotor CMV para la expresión constitutiva en células eucariotas y el gen de resistencia a kanamicina para la selección de clonas recombinantes. Además, contiene una secuencia inmunoestimuladora (ISS) del gen de resistencia a ampicilina, así como un intron A truncado para una mayor eficiencia de la expresión (Aldevron).

CONSTRUCCIONES GÉNICAS

- CRT/E7: Consiste en la fusión de la calreticulina (CRT) a la oncoproteína E7 mutante, ésta última presenta una sustitución de las cisteínas por glicinas en los aminoácidos 58 y 91 y la delección de los aminoácidos 24-26, para evitar su capacidad transformante, pero conservando las secuencias de los péptidos inmunogénicos.
- SA/E7/4-1BBL: Consiste en el extremo amino de un péptido señal, seguido del núcleo de la estreptavidina, la oncoproteína E7 mutante y en el extremo carboxilo el dominio extracelular de 4-1BBL.
- SA/4-1BBL: Consiste en el núcleo de estreptavidina seguido del dominio extracelular de 4-1BBL. Esta construcción se obtuvo por digestión de SA/E7/4-1BBL con las enzimas de restricción *NheI* y posterior ligación, eliminando así el fragmento de E7.

BACTERIAS

- *Escherichia coli* DH5 α : Cepa bacteriana para la replicación de los plásmidos (18265001, Thermo Fisher Scientific).

LÍNEAS CELULARES

- HEK-293: Células embrionarias de riñón humano transfectadas con el gen E1 del adenovirus 5 integrado en su cromosoma 19 (CRL-1573, ATCC).
- TC-1: Células tumorales de pulmón de ratón de la cepa C57BL/6 co-transformadas con las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16 (CRL-2785, ATCC, descontinuada).

MODELO ANIMAL

Ratones *Mus musculus* hembras de la cepa C57BL/6 de 7 semanas, adquiridos de Círculo de ADN S.A. de C.V. (Ciudad de México). Los ratones fueron alojados en el Bioterio del Departamento de Histología. Los murinos permanecieron bajo ciclos de 12 horas luz/oscuridad con agua y alimento (pellets) *ad libitum* en jaulas transparentes con encamado. Éstos fueron evaluados a diario para determinar su estado de salud, además de cambiar el encamado cada tercer día. Los ratones que presentaron heridas/úlceras en zona de tumor fueron sacrificados por dislocación cervical. Los cadáveres de murinos y sus desechos fueron confinados en bolsas amarillas y enviados al incinerador de la Facultad de Medicina, donde se llevó a cabo su deposición final. El uso y manejo de los ratones se hizo por personal con conocimiento de los lineamientos básicos descritos en la NOM-062-ZOO-1999 y la Guía de Manejo y Uso de Animales del NIH. Así mismo fueron evaluados y aprobados por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UANL bajo el siguiente número de registro: HT17-00001.

ANTICUERPOS

- Anticuerpo monoclonal de murino Anti-E7 (NM2: sc-65711, Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo monoclonal de rata anti-TNFSF9 (RM0067-3H19: ab86575)
- Anticuerpo policlonal de conejo Anti-IgG de ratón conjugado con HRP (A9044, Sigma-Aldrich)
- Anticuerpo policlonal de cabra Anti-IgG murina conjugada con CF594 (20111, Biotium)
- Anticuerpo policlonal de cabra Anti-IgG de rata conjugada con FITC (31629, Thermo Fisher)

ENZIMAS

- Shrimp Alkaline Phosphatase (M037S01, NEB)
- T4 ADN ligase (M0202S, NEB)
- CutSmart (B7204S, NEB)
- Endonucleasa *Sall* (R0138S, NEB)
- Endonucleasa *Bgl*II (R0144S, NEB)
- Endonucleasa *Nhe*I (R0131S, NEB)

MEDIOS DE CULTIVO

- Medio Brother Miller, LB (C14041701, US Biological)
- Medio DMEM “Medio Dubelcco’s Modified Eagle Medium” (12491-015, Gibco)
- Medio RPMI 1640 “Medio Roswell Park Memorial Institute” (11875-093, Gibco)

REACTIVOS

- Acetato de potasio (P1190, Sigma-Aldrich)
- Ácido acético glacial (64-19-7, Jalmek)
- Ácido etilendiaminotetraacético, EDTA (S311, Fisher Scientific)
- Acrilamida/Bis-Acrilamida 30% (A3699, Sigma-Aldrich)

- Agar (A-1296, Sigma-Aldrich)
- Agarosa (15510-027, Invitrogen)
- Agua bidestilada (Laboratorios Monterrey)
- Antibiótico-antimicótico: Penicilina-Estreptomicina (30-004-CI, Corning)
- Antibiótico G-418 (11811023, Thermo Fisher Scientific)
- Ampicilina (A2260, USBiological)
- Azul de tripano (15250061, Gibco)
- BSA (B90015, NEB)
- Buffer 3.1 (B7203S, NEB)
- Buffer 2.1 (B7202S, NEB)
- Buffer de carga para ADN "Gel-Red" (41003, Biotium)
- Buffer de carga para proteínas 4X (Gibco)
- Cloruro de calcio, CaCl_2 (C3306, Sigma-Aldrich)
- Cloruro de Sodio, NaCl (746398, Sigma-Aldrich)
- Ditioneitol, DTT (3483-12-3, Sigma-Aldrich)
- DMSO "Dimetilsulfóxido" (D8418, Sigma-Aldrich)
- Dodecilsulfato sódico, SDS (9602L, Probiotek)
- Etanol (CTR)
- Espermidina (S0266-1G, Sigma-Aldrich)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF (P7626, Sigma-Aldrich)
- G418: Genetocida (11811023, Thermo Fisher Scientific)
- Gel Loading Dye Purple 6X (B7024S, NEB)
- Gene Clean Gel Extration Kit (L00418, GeneScript)
- Glicina (G8898, Sigma-Aldrich)

- Glucosa (G8270, Sigma-Aldrich)
- Glutamina: Glutamax (35050-061, Gibco)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (S318, Fisher Scientific)
- Inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich)
- Isopropanol (9095, JT. Baker)
- Kanamicina (K0010, USBiological)
- Leche descremada (Svelty)
- Marcador de peso molecular 1 Kb (N3232S, NEB)
- Metanol 100% (M6125, Jalmek)
- Partículas de oro de 1 μ m (1652263, Bio-Rad)
- PageRuler Plus PrestainedProtein (26619, Thermo Fisher Scientific)
- Pierce BCA ProteinAssay Kit (23225, Thermo Fisher Scientific)
- Persulfato de amonio (A3678, Sigma-Aldrich)
- Piruvato (11360-070, Gibco)
- Polivinilpirrolidona, PVP (P5288, Sigma-Aldrich)
- PlasmidMidiPrep Kit (L00420-100, GeneScript)
- ProteoJet (K0301, Fermentas)
- Supersignal West Pico (34080, Thermo Fisher Scientific)
- Tetrametiletilendiamina, TEMED (T7024, Sigma-Aldrich)
- Tripsina (9002-07-7, Gibco)
- Tris-base (93352, Sigma-Aldrich)
- Tris-HCl pH 6.8, 0.5 M (210001627, Bio-Rad)
- Tris-HCl pH 8.8, 1.5 M (2014-06, Gibco)
- Tris-hidroxicloruro (T-3253, Sigma-Aldrich)

- Turbofect (R0531, Thermo Fisher Scientific)
- Tween-20 (91379, Sigma-Aldrich)
- VectaShield con DAPI (H-1200, Vector Laboratories)

SOLUCIONES

- Agar-LB: 2.5 g de LB y 1.5 g de agar
- Ampicilina: 100 µg/µl de ampicilina y 1 ml de agua bidestilada
- Buffer de carga para proteínas 1X: 600 µl del buffer de carga 4X, 400 µl de DTT, 1 µl de PMSF y 10 µl del inhibidor de proteasas
- Buffer de corrida 10x: 30 g de Tris-Base, 144 g de glicina, 10 g de SDS y aforar en 1 L de agua bidestilada
- Buffer de corrida 1X: 100 ml del buffer de corrida 10X y 900 ml de agua bidestilada
- Buffer de lisis: 500 µl de ProteoJet, 1 µl de PMSF y 5 µl de inhibidor de proteasas
- Buffer TAE 50X: 2.42 g de Tris-base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M y aforar en 1 L de agua bidestilada
- Buffer TAE 1X: 20 ml del buffer TAE 50X y 980 ml de agua bidestilada
- Buffer de transferencia: 6.05 g Tris-Base, 28.7 g de glicina, 1 ml de SDS 10%, 200 ml de metanol 100% y aforar en 1 L de agua bidestilada
- Buffer TBS 10X: 308 g de NaCl, 43.35 g de Tris-Base y aforar en 3 L de agua bidestilada
- Buffer TBST 1X: 100 ml de TBS 1X, 900 ml de agua bidestilada y 500 µl de Tween-20
- Ditioneitol (DTT): 75 mg de DTT y 500 µl de agua bidestilada
- Dodecilsulfato sódico 10% (SDS): 10 g de SDS Y 100 ml de agua bidestilada
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF): 8.7 mg de PMSF y 500 µl de isopropanol
- Kanamicina: 50 µg/µl de kanamicina y 1 ml de agua bidestilada
- Medio LB: 3.75 gr de LB y 150 ml de agua bidestilada en matraz de 1000

- Medio SOC: medio LB + 20 mM de glucosa
- Leche descremada 10%: 3 g de leche descremada y 30 ml de TBST
- PBS 10X: 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 4.4 g de Na₂HPO₄, 2.4 g de KH₂PO₄ y aforar en 1 L de agua bidestilada a un pH 7.4
- PBS 1X: 100 ml de PBS 10X y 900 ml de agua bidestilada
- Persulfato de amonio 10%: 50 mg de persulfato de amonio y 500 ml de agua bidestilada
- Solución I Miniprep: 1.25 ml de glucosa 2M, 1 ml de EDTA 0.5M, 1.25 ml de Tris-HCl 1M y 46.50 ml de agua bidestilada
- Solución II Miniprep: 300 ml NaOH 10 M, 1.5 ml de SDS 10% y 13.02 ml de agua bidestilada
- Solución III Miniprep: 5.75 ml de ácido acético glacial, 30 ml de acetato de potasio 5 M y 14.25 ml de agua bidestilada

CONSUMIBLES

- Cajas de cultivo celular de 75 cm² y 25 cm² (Corning)
- Cajas Petri de 60 mm (Corning)
- Cartridge Kit (Bio-Rad)
- Cartucho de 70 cm para Gene-gun (Bio-Rad)
- Criotubos de 2 ml (Corning)
- Espátulas de plástico (Corning)
- Jeringas de insulina 0.5 ml (BD Ultrafine)
- Matraces de 1000 ml y 250 ml (Kimax)
- Membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (GVS FilterTechnology)
- Placas de 6, 24 y 96 pozos (Corning)
- Pipetas serológicas 10 ml y 5 ml (Corning)

- Pipetor para cultivo celular (Labnet)
- Tubos eppendorf de 1.7 ml y 600 μ l (Costar y Corning)
- Tubos falcón de 50 ml y 15 ml (Corning y ThermoScientific)

EQUIPO DE LABORATORIO

- Autoclave (FE-397, Felisa)
- Balanza analítica (GR-120, AND)
- Baño de perlas para cultivo celular (74300-714, LabArmor)
- Cámara de electroforesis para geles de agarosa (B1A, OwlSeparationSystems, Inc.)
- Cámara de electroforesis para geles de poliacrilamida (Mini-Protean, Bio-Rad)
- Cámara de Neubauer (BBC, Propper)
- Cámara de transferencia (TransBlot SD Semi-Dry, Bio-Rad)
- Campana de flujo laminar nivel II (UN-425-400, LabGard)
- Centrífuga para tubos eppendorf (A1-15K, Sigma)
- Centrífuga para tubos falcón (Sorval STR 16R, ThermoScientific)
- Espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf)
- Estación para biobalística (Bio-Rad)
- Fuente de poder (300 Plus, Labnet)
- Incubadora de CO₂ para cultivo celular (370, ThermoElectronCorporation)
- Incubadora para bacterias (TU-400, MRC)
- Incubadora refrigerada (LM-570, MRC)
- Lector de placas ELISA (iMARK, Bio-Rad)
- Micropipetas 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l (Labnet)
- Microscopio confocal con fluorescencia (LSM 710, Carl Zeiss)

- Microscopio invertido (9804439, Southern Precision Instrument)
- Refrigerador 4°C/ -20°C (RS25J5008SP, Samsung)
- Sistema Gene-gun (1652451, Bio-Rad)
- Software para gráficas y análisis estadísticos (GrapPadPrism 6)
- Sonicador (Transsonic 420, Lab-line Elma)
- Tanque de nitrógeno (7440-59-7, Praxair)
- Termociclador (PTC-100, MJ Research Inc.)
- Transiluminador UV (2000, Bio-Rad)
- Ultracongelador -80°C (RevcoValue Plus, Thermo Fisher Scientific)
- Vernier digital (Truper)
- Vortex (Genie 2, Daigger & CO, Inc.)

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Como medidas de bioseguridad especiales para el uso de ADN recombinantes se llevaron a cabo las recomendaciones del NIH para organismos de tipo BSL1.

Se realizó la descontaminación diaria de la campana de flujo laminar donde se trabajó, así como lavarse las manos antes y después de trabajar con estos organismos y a pesar de que la línea tumoral TC-1 no es contagiosa ni transmisibles por vía aérea, se utilizó bata, cubrebocas, guantes de nitrilo y calzado cerrado para la manipulación de los mismos.

Así mismo, todos los materiales utilizados fueron descontaminados con cloro al 4% antes de ser lavados para su reutilización o desecho en contenedores con bolsas rojas, mientras que las jeringas utilizadas fueron desechadas en contenedores plásticos especiales para punzocortantes de color rojo. Finalmente, los residuos fueron recolectados y enviados al incinerador de la Facultad de Medicina.

En caso de se hubiese presentado algún accidente, la persona debía ser llevada a valoración médica al servicio de Urgencias del Hospital Universitario de la UANL y se reportaría al Comité de Ética en Investigación y al Comité de Bioseguridad.

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos fueron manejados con respecto a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

METODOLOGÍA

DISEÑO Y CONTRUCCIÓN DE LOS VECTORES

El diseño de SA/E7/41BBL se basó en el sistema de complejos proteicos, colocando a la oncoproteína E7 mutada entre SA y 4-1BBL flanqueada por linkers (Gly4Ser)₃ que mejoran la estabilidad del péptido 41BBL permitiendo el correcto plegamiento de las proteínas sin afectar la estructura y función individual de SA-4-1BBL. La mutación de la oncoproteína E7 presenta la sustitución de glicinas en las cisteínas 58 y 61, así como la delección de los aminoácidos 21-24 con el fin de eliminar el riesgo oncogénico. En el extremo carboxilo se mantuvo el dominio extracelular de 4-1BBL (aa 104 al 309) que es requerido para la unión y la traducción de señales a través del receptor 4-1BB; en el otro extremo de E7 se colocó el núcleo de la estreptavidina (aa 13 al 139) para la formación de los tetrámeros siendo importante para potenciar la inmunogenicidad de E7 por parte de la señal coestimuladora de 4-1BBL a través de su receptor 4-1BB y se agregó en el extremo amino el péptido señal de calreticulina (MLLPVPLLLGLLGLAAAL) para permitir que la proteína sea secretada.

Una vez sintetizado el gen SA/E7/4-1BBL en el plásmido PUC57 de la compañía de GenScript, éste se subclonó utilizando los sitios *SalI* y *BglII* en el plásmido pUMVC4a (figura 9), el cual ha sido ampliamente reportado en estudios para evaluar la respuesta inmune debido a que contiene una secuencia inmunoestimuladora.

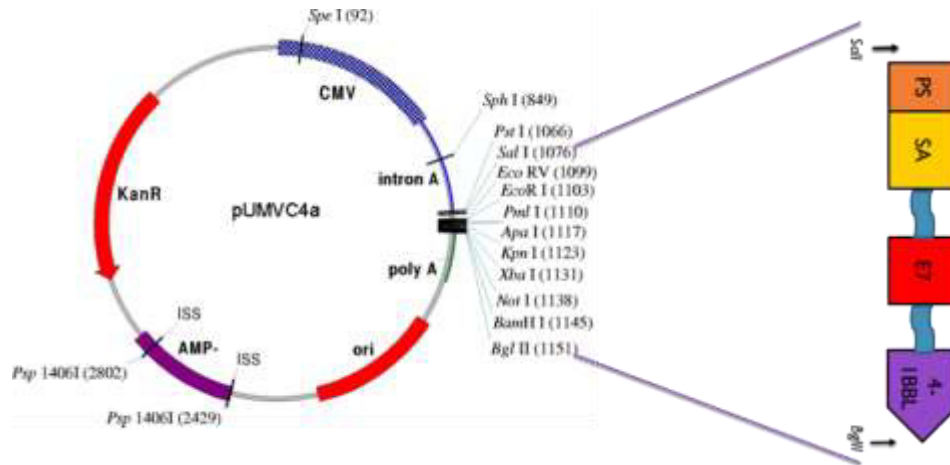


Figura 9. Subclonación del SA/E7/4-1BBL. Se muestran los sitios utilizados para insertar SA/E7/4-1BBL en el vector pUMVC4a.

Posteriormente se contempló la adición de sitios de restricción que permitieran la eliminación de la proteína E7 utilizando los sitios *NheI*, los cuales flanquean uno de los linker y a E7, para eliminar dicha oncoproteína y obtener la construcción de SA-4-1BBL (figura 10), la cual servirá como un control de referencia de la inmunestimulación por 4-1BBL.

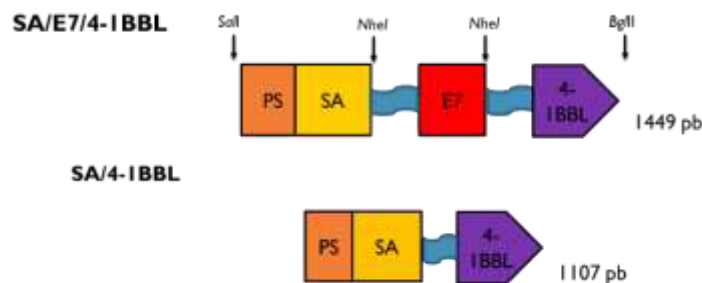


Figura 10. Obtención de SA/4-1BBL. Se muestra la localización de los sitios *NheI* presentes en la construcción SA/E7/4-1BBL para obtener la construcción SA/4-1BBL.

Se utilizó la construcción CRT/E7, la cual ha sido reportada como una vacuna de ADN con efecto antitumoral que se encuentra en etapas clínicas y que ha sido reportada por diversos autores y también ha sido evaluada en nuestro laboratorio, por lo que la utilizaremos como un control positivo de efecto antitumoral. Por último, también se utilizó el plásmido vacío pUMVC4a como control negativo.

DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Siguiendo el protocolo descrito por el fabricante se prepararon reacciones de digestión de 500 ng/ μ l de ADN de las construcciones PUC57: SA/E7/4-1BBL, pUMVC4A: SA/E7/4-1BBL, pUMVC4: SA/4-1BBL y pUMVC4 con *SalI* y *Bg/III* para observar la liberación del inserto y con *NheI* para observar la liberación de E7. Las reacciones se incubaron a 37°C por toda la noche para obtener una mayor cantidad de fragmentos liberados. Al día siguiente se cargaron 10 μ l de muestra (250 ng) con 5 μ l del buffer de carga para una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se tiñó con Gel Red para visualizar los fragmentos bajo luz UV.

LIGACIÓN DE GENES EN PLÁSMIDOS

Se purificaron los insertos a ser clonados con el kit QuickClean II Gel Extraction siguiendo el procedimiento del proveedor, posteriormente el vector fue desfosforilado con fosfatasa alcalina y se colocó en el termociclador a 37°C por 30 min y 65°C por 10 min. Finalmente, la ligación se realizó con la ligasa T4 en un volumen final de 15 μ l y se colocó en el termociclador a 25°C por 2 hrs y 70°C por 10 min.

OBTENCIÓN DE BACTERIAS CALCIO COMPETENTES

Se sembraron 20 μ l del stock de *Escherichia coli* DH5 α (almacenado a -80°C) en 5 mL de medio LB y se dejó incubando a 37°C toda la noche con agitación a 120 rpm. Al día siguiente se pasaron 2 mL de cultivo a los 100 mL de medio LB fresco y nuevamente se dejó incubando a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.35-0.45. Se incubó en hielo por 10 min, se colectó la pastilla celular por centrifugación a 4000 rpm a 4°C por 5 min y posteriormente se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 0.075M/15% de glicerol incubando en hielo por 5 min. Nuevamente se centrifugó, resuspendió e incubó la pastilla con la solución CaCl₂/glicerol. Finalmente se volvió a centrifugar y la pastilla fue resuspendida en 2 mL de la solución CaCl₂/glicerol. Manteniendo la cadena de frío, se realizaron alícuotas de 50 μ l en tubos eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CALCIO COMPETENTES

Se tomó un vial de 50 μL de bacterias calcio competentes almacenadas a -80°C , se descongeló en hielo por 10 min aproximadamente. Se añadió el ADN (1-50 ng, sin superar el 10% del volumen total) y se incubó en hielo por 20 min. Para realizar el choque térmico se sumergió el vial en el baño de agua a 42°C por 1 minuto y después en hielo por 2 min. Se añadió 450 μL de medio SOC (20 Mm de glucosa en medio LB), se mezcló por inversión y se incubó a 37°C con agitación por 40 min. Se colocaron 50 μL de bacterias en relación 1:10 y 9:10, en placas petri con medio agar-LB para cada una de las construcciones. Se incubaron las placas petri a 37°C por toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron las colonias positivas con ayuda de una micropipeta y se colocaron en sus respectivos tubos con medio LB para evaluar la presencia del plásmido. Se incubaron a 37°C con agitación a 120 rpm.

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Se activaron las construcciones con 50 μL del stock (almacenado a -80°C) en 5 mL de medio LB con el antibiótico de selección (Ampicilina para PUC57 y Kanamicina para pUMVC4a) y se dejó incubando a 37°C con agitación a 120 rpm toda la noche. Al día siguiente se pasaron 4 mL de cultivo en 150 mL de medio LB fresco con el antibiótico de selección y nuevamente se dejó incubando a 37°C con agitación a 120 rpm toda la noche y se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior. Se tomaron 4.5 ml de cada una de las construcciones en su respectivo tubo eppendorf para realizar miniprep y centrifugar el resto del volumen en los tubos falcón de 50 ml para cada una de las construcciones a 4,500 rpm por 20 min para coleccionar la pastilla celular de cada construcción para realizar el midiprep. Para el miniprep, se obtuvo la pastilla por centrifugación a 14,000 rpm por 30 segs, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 150 μL de la solución I con vortex, 300 μL de la solución II con inmersión suave y 230 μL de la solución III con inmersión suave y se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 10 min. Se coleccionó 600 μL del sobrenadante en un tubo nuevo, se añadió un volumen igual de

isopropanol frío, se incubó a -20°C por 10 min, se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 12 min, se retiró el sobrenadante, se lavó la pastilla de ADN obtenida con 1 ml de etanol 70% y una vez seca se resuspendió en 40 μL de agua milliQ. Mientras que para el midiprep, la pastilla se resuspendió en 4 ml del buffer P1 con micropipeta, 4 ml del buffer P2 con 5 inmersiones suave a temperatura ambiente por 5 min y 4 ml del buffer P3 con 5 inmersiones suave hasta la desaparición del color azul e incubó a -20°C por 15 min y se centrifugó a 11,500 rpm a 4°C por 30 min, se pasó el sobrenadante por la columna de QBT en un tubo nuevo, se lavó con 10 ml del buffer QC 2 veces, se pasó la columna a un tubo nuevo y se añadió 5 ml del buffer eluyente, 3.5 ml de isopropanol con inmersión suave , se centrifugó a 11,500 rpm a 4°C por 10 min, se retiró el sobrenadante, se lavó la pastilla de ADN obtenida con 2 ml de etanol 70% y una vez seca se resuspendió en 50 μL de TE 1X. Al día siguiente se cargaron 50 ng/ μL de las muestras en un gel de agarosa al 1% para su visualización.

CULTIVO CELULAR

Las células HEK-293 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con FBS 10%, glutamina 2 mM, piruvato 1X, antibiótico-antimitótico. Mientras que las células TC-1 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con FBS 5%, piruvato 1X, antibiótico-antimitótico y G418 200 ng/ml.

WESTERN BLOT

Se cultivaron 4×10^5 células HEK-293 en 5 pozos de una placa de 6 pozos con 4 ml de medio DMEM 10% y se incubaron a 4°C toda la noche. Al día siguiente se transfectaron añadiendo el mix de 400 μL de medio DMEM sin suplementar, 2 μg de ADN y 6 μL de Turbofect en su respectivo pozo. A las 24 horas fueron colectadas las células, se lavaron con PBS 1X frío y se lisaron con 50 μL del buffer de lisis en hielo por 20 min, para proceder a la cuantificación mediante el kit BCA, utilizando BSA para la curva de estándares. Se cargaron 50 μg de proteína en un gel de poliacrilamida 10% y se corrió la electroforesis a 80 V. Después, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (Polifluoruro de vinilideno) a 120 mA por 1 hora. Se bloqueó la membrana con 10% de leche descremada a

temperatura ambiente en agitación por 1 hora. Se retiró la solución de bloqueo, se incubó con los anticuerpos primarios, anti-E7 y anti-SA en una dilución 1:500 a 4°C con agitación toda la noche. La membrana fue lavada con TBST a 4°C con agitación 3 veces por 15 min. Posteriormente se incubó con anti-mouse conjugado con HRP en una dilución 1:5000 con agitación a 4°C por 2 horas y fue nuevamente lavada 3 veces con TBST. Finalmente se detectó la reacción por quimioluminiscencia usando el sustrato Supersignal West Pico en una proporción 1:1 sustrato-cromógeno.

INMUNOCITOFLUORESCENCIA

Se sembraron 2×10^4 células HEK-293 en 7 pozos de una placa de 8 pozos con 400 μ l de medio DMEM 10% y se incubaron a 4°C toda la noche. Al día siguiente se transfectaron añadiendo el mix de 50 μ l de medio DMEM sin suplementar, 100 ng de ADN y 1 μ l de Turbofect en su respectivo pozo. Al día siguiente, se retiró el medio, se lavaron las células con PBS 1X frío, se fijaron con una mezcla de 1:1 de metanol-acetona frío por 1 min y nuevamente fueron lavadas con PBS 1X frío. Se bloqueó con BSA a 4°C en agitación por 1 hora. Después, se retiró la solución de bloqueo, se incubó con los anticuerpos primarios anti-E7 y anti-TNFSF9 en una dilución 1:500 a 4°C con agitación toda la noche. Se lavaron con PBS 1 X frío a 4°C con agitación 3 veces por 5 min. Posteriormente se incubó con los anticuerpos secundarios anti-mouse Alexa Fluor 594 para anti-E7 y anti-rat Alexa Fluor 488 para anti-TNFSF9 en una dilución de 1:3000 a 4°C en oscuridad por 2 horas y fue nuevamente lavada 3 veces con PBS 1X. Finalmente se añadió DAPI por 15 min y se analizaron en microscopio de fluorescencia.

PREPARACIÓN DE BALAS DE ADN

Se pesó 25 mg de partículas de oro de 1 μ m en un tubo eppendorf de 1.7 ml al que se le adicionó 50 μ l de espermidina 0.05M con agitación vigorosa por 1 min en vortex y 5 segs en ultrasonificador, 50 μ g de ADN con agitación vigorosa por 5 segs y manteniendo la mezcla en vortex se añadió gota a gota 50 μ l del CaCl_2 1M, la cual se dejó sedimentar a temperatura ambiente por 10 min. Se

centrifugó 15 segs, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet con vortex, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol 3 veces, se resuspendió en 3 ml de PVP (polivinilpirrolidona) en un tubo de 15 ml y se guardó a -20°C hasta su uso posterior.

Se conectó la Turbing Prep Station al tanque de óxido nitroso, se colocó un tubo de ~75 cm por el que se pasó el nitrógeno a un flujo de 0.4 LPM por 15 min para extraer la humedad, se cerró la válvula y con ayuda de una jeringa de 10 ml se llenó el tubo con cada una de las construcciones de 3 ml de la mezcla ADN:Oro, la cual se colocó en la Turbing Prep Station y se dejó sedimentar por 5 min, se retiró el sobrenadante con la jeringa, se giró 90° el tubo por 2 segs 2 veces y se dejó girando por 5 min, se paró por 30 segs para que se adhiriera el complejo ADN:Oro, se volvió a girar por 5 min. Finalmente se apagó la Turbing Prep Station y se cortó el tubo para obtener los cartuchos, los cuales se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior.

ENSAYO PROFILÁCTICO

Se utilizaron 5 ratones de la cepa C57BL/6 hembras de 7 semanas por grupo, a las que se les realizaron dos inmunizaciones cada siete días con 1 µg de ADN a 300 psi en el abdomen con ayuda del sistema Helios Gene Gun, una semana después de la última inmunización se realizó el implante sc de 5×10^4 células tumorales TC-1 en el flanco derecho. Diez días después del implante se midió el ancho y largo del tumor cada tercer día con ayuda del vernier para graficar el volumen del tumor, el cual se calcula con la fórmula: $(\text{Diámetro menor})^2 (\text{Diámetro mayor}) / 2$. La fecha de muerte o sacrificio de los ratones fue graficada para comparar la protección contra el desarrollo de tumores que expresen E7 en los distintos tratamientos.

ENSAYO TERAPÉUTICO

Se utilizaron 5 ratones de la cepa C57BL/6 hembras de 7 semanas por grupo, a las que se les realizaron el implante sc de 5×10^4 células tumorales TC-1 en el flanco derecho, una semana después

del implante se realizaron dos inmunizaciones cada siete días con 1 µg de ADN a 300 psi en el abdomen con ayuda del sistema Helios Gene Gun. Diez días después de la última inmunización se midió el ancho y largo del tumor cada tercer día con ayuda del vernier para graficar el volumen del tumor, el cual se calcula con la fórmula: $(\text{Diámetro menor})^2 (\text{Diámetro mayor}) / 2$. La fecha de muerte o sacrificio de los ratones fue graficada para comparar si presentan un efecto antitumoral los distintos tratamientos.

ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos del ensayo profiláctico y terapéutico fueron analizados y graficados con el programa GraphPad Prism utilizando la prueba de Tukey como post-hoc para determinar diferencia significativa entre todos los grupos ($p < 0.05$).

RESULTADOS

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS VECTORES PARA LA EXPRESIÓN DEL ADYUVANTE 4-1BBL SOLO Y FUSIONADO AL ANTÍGENO E7.

La construcción SA/E7/41BBL se basó en los complejos proteicos manteniendo en el extremo carboxilo el dominio extracelular del ligando, en el extremo amino se colocó un PS para permitir que la proteína sea secretada, seguida de la SA y se colocó E7 entre SA y 4-1BBL, flanqueada por linkers, los cuales permiten conservar la estructura y función de cada elemento.

A continuación, se muestra el diseño de la secuencia de SA/E7/4-1BBL (figura 11), en donde se marca en verde el PS, en amarillo el núcleo de la SA (aa 13 al 139), en rojo la oncoproteína E7 flanqueado por dos linkers marcados en azul y en morado el dominio extracelular de 4-1BBL (aa 104 al 309).

```
AGATCTGCCGCCACCATGCTTCTGTCAGTACCACTGCTTCTGGGCCTATTGGGATTGGCTGTGGCTATCACCGGC
ACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGCGCCGATGGCGCCCTGACCGGAACCTACG
AGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCCTGACCGGTGCTTACGACAGCGCCCGGCCACCGACG
GCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGCAACGCCCACTCCGCGACCACTG
GGAGCGGCCAGTACGTCGGCGGGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGGCTATTGACCTCCGGCGCCACC
GAGGCCAACGCCTGGAAGTCCACGCTGGTGGCCACGACACCTTCACCAAGGTGAAGCCGTCGCGCCCTCA
AGCGTCGACGCTGAAGCTGCAGCTAAAGAAGCTGCAGCTAAAGCTGCTGCTATGCATGGAGATACACCTACAT
TGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAG
AGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCATTACAATATTGTAACCTT
TTGTTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACAGTAGACATTGTACTTTGGAAGACC
TGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAAACCGTCGACGCTGAAGCTGCAGCTAAA
GAAGCTGCAGCTAAAGCTGCTGCTCGCACCGAGCCTCGGCCAGCGCTCACAATCACCACTCGCCCAACCTGG
GTACCCGAGAGAATAATGCAGACCAGGTCAACCCCTGTTCCACATTGGCTGCCCAACTACACAACAGGG
CTCTCTGTGTTGCGCAAGCTACTGGCTAAAAACCAAGCATCGTTGTGCAATCAACTCTGAACTGGCACAGCC
AAGATGGAGCTGGGAGCTCATACCTATCTCAAGGCTGAGGTACGAAGAAGACAAAAGGAGTTGGTGGTAG
ACAGTCCCGGGCTCTACTACGTATTTTGGAACTGAAGCTCAGTCCAACATTCACAAACACAGGCCACAAGGT
GCAGGGCTGGGTCTCTTGTGTTTGAAGCAAAGCCTCAGGTAGATGACTTTGACAACCTGGCCCTGACAGTG
GAACTGTTCCCTTGCTCCATGGAGAACAAGTTAGTGGACCGTTCCTGGAGTCAACTGTTGCTCCTGAAGGCTG
GCCACCGCCTCAGTGTGGGTCTGAGGGCTTATCTGCATGGAGCCAGGATGCATACAGAGACTGGGAGCTGTC
TTATCCCAACACCACCGCTTTGGACTTCTTCTGTGAAACCCGACAACCCATGGGAATGAAGCTT
```

Sitios de restricción
Péptido señal
Estreptavidina
Linker
E7
4-1BBL

Figura 11. Diseño del gen SA/E7/4-1BBL. Se muestra el diseño de la fusión génica SA/E7/4-1BBL

Para corroborar el correcto diseño de las construcciones se realizaron dos caracterizaciones (figura 12), en el primer gel (izquierda) se observó la liberación del inserto mediante la digestión con *Sall* y *BglII* de nuestra construcción de interés SA/E7/4-1BBL, en el vector en el que se clonó (carril 1) y en el vector en el que se subclonó (carril 2), seguida de la SA/4-1BBL (carril 3) y finalmente el plásmido vacío (carril 4), obteniendo las bandas de 3329 pb y 4404 pb correspondientes a los vectores PUC57 y pUMVC4a y las bandas de 1,449 pb para nuestra construcción de interés y 1,107 pb para SA/4-1BBL debido a la eliminación de E7 en dicha construcción. En el segundo gel (derecha) se observó la liberación de E7 mediante la digestión con *NheI* de SA/E7/4-1BBL (carril 1) y SA/4-1BBL (carril 2) obteniendo la banda esperada de 342 pb del fragmento liberado por E7 para nuestra construcción de interés.

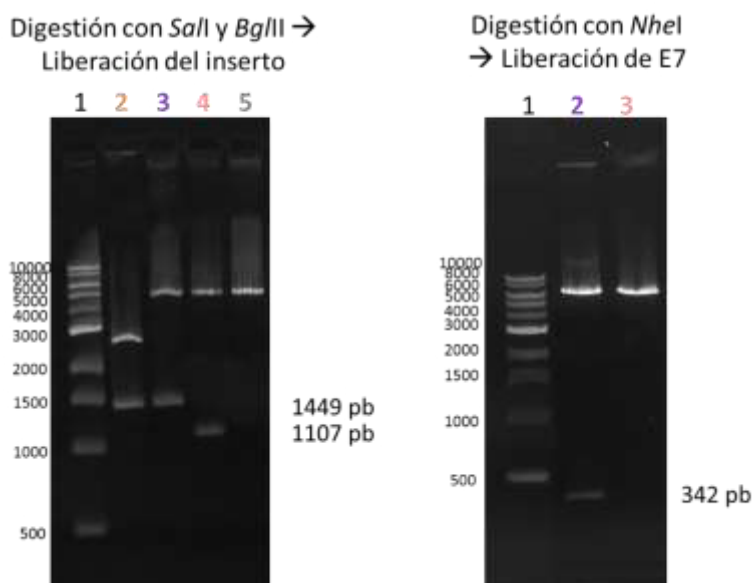


Figura 12. Caracterización de las construcciones. Se muestra los resultados de la caracterización para observar la liberación del inserto (izquierda) y la caracterización realizada para observar la liberación de E7 (derecha). 1. Marcador de peso molecular, 2. PUC57: SA/E7/4-1BBL, 3. pUMVC4a: SA/E7/4-1BBL, 4. pUMVC4a: SA/4-1BBL, 5. Vector vacío (pUMVC4a).

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA E7 MEDIANTE WESTERN BLOT, ASÍ COMO DE E7 y 4-1BBL MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.

El siguiente paso fue corroborar que las construcciones sean capaces de expresar las proteínas en células eucariotas mediante dos ensayos: Western Blot (WB) e inmunofluorescencia (IF).

Para el WB se sembraron células HEK-293, éstas se transfectaron con las construcciones, se lisaron para obtener el extracto, se cuantificaron para cargar 40 μ l de proteína en un gel de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana PVDF y se realizó la detección de la expresión de la proteína E7 utilizando anticuerpos específicos contra E7.

Como resultado se muestra la membrana obtenida del WB (figura 13), detectando las bandas del tamaño esperado de 68 kDa y 47 kDa correspondientes a la expresión de nuestro control positivo (carril 1) y la construcción de interés (carril 2) respectivamente. Mientras que nuestro control de células sin transfectar (carril 5), control negativo (carril 4) y SA/4-1BBL (carril 3), debido a que no contienen E7 en su construcción no presentan banda alguna.

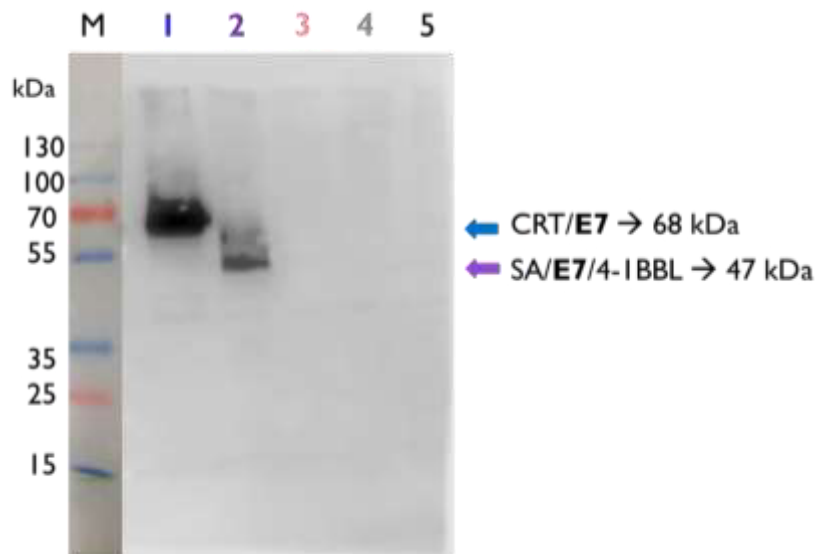


Figura 13. Detección de la expresión de la proteína E7 mediante WB. Extractos totales de células HEK-293 transfectadas con las diferentes construcciones, las cuales se corrieron en geles de poliacrilamida SDS, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpos específicos contra E7. Detectando señales de 68 y 47 kDa correspondientes a CRT/E7 y SA/E7/4-1BBL respectivamente. M, Marcador de peso molecular; 1, CRT/E7; 2, SA/E7/4-1BBL; 3, SA/4-1BBL; 4, Vector vacío; y 5, Control de células sin transfectar.

Puesto que las construcciones llevan un péptido señal esperaríamos que las proteínas se localicen en RE. Por tal motivo y para confirmar la expresión de éstas, se llevó a cabo la detección de las proteínas directamente sobre las células mediante inmunofluorescencia. Para esto se sembraron células HEK-293, se transfectaron con las construcciones correspondientes, se fijaron, se bloquearon sitios inespecíficos y las proteínas E7 y 4-1BBL se detectaron utilizando anticuerpos específicos.

Como resultado se muestran las dos inmunofluorescencias realizadas (figura 14). Para la detección de la proteína E7 se utilizó un anticuerpo secundario marcado con CF594 y la proteína 4-1BBL se detectó con un anticuerpo secundario marcado con FITC. Además, se utilizó DAPI como marcador de núcleos y como era esperado, todas las muestras fueron positivas para este marcador. En la detección de E7 nuestro control negativo y SA/4-1BBL no mostraron señal debido a que no contienen E7 en su secuencia, mientras que si se observa la señal positiva roja para nuestro control positivo y la construcción de interés. Para la detección de 4-1BBL se observa que tanto nuestro control negativo y positivo no muestran señal, ya que ambos carecen de la secuencia génica de 4-1BBL, mientras que las otras dos construcciones que contienen 4-1BBL muestran señal positiva verde para esta proteína.

Es importante señalar que la distribución de la señal de las proteínas que contienen E7 y 4-1BBL se encuentran distribuidas a lo largo de la célula excepto en el área del núcleo, correspondiendo a un patrón observado en aquellas proteínas que se localizan en el RE alrededor del núcleo. Esto concuerda con el hecho de que las tres construcciones (CRT/E7, SA/E7/4-1BBL y SA/4-1BBL) poseen un péptido señal que determina la localización de éstas proteínas en RE.

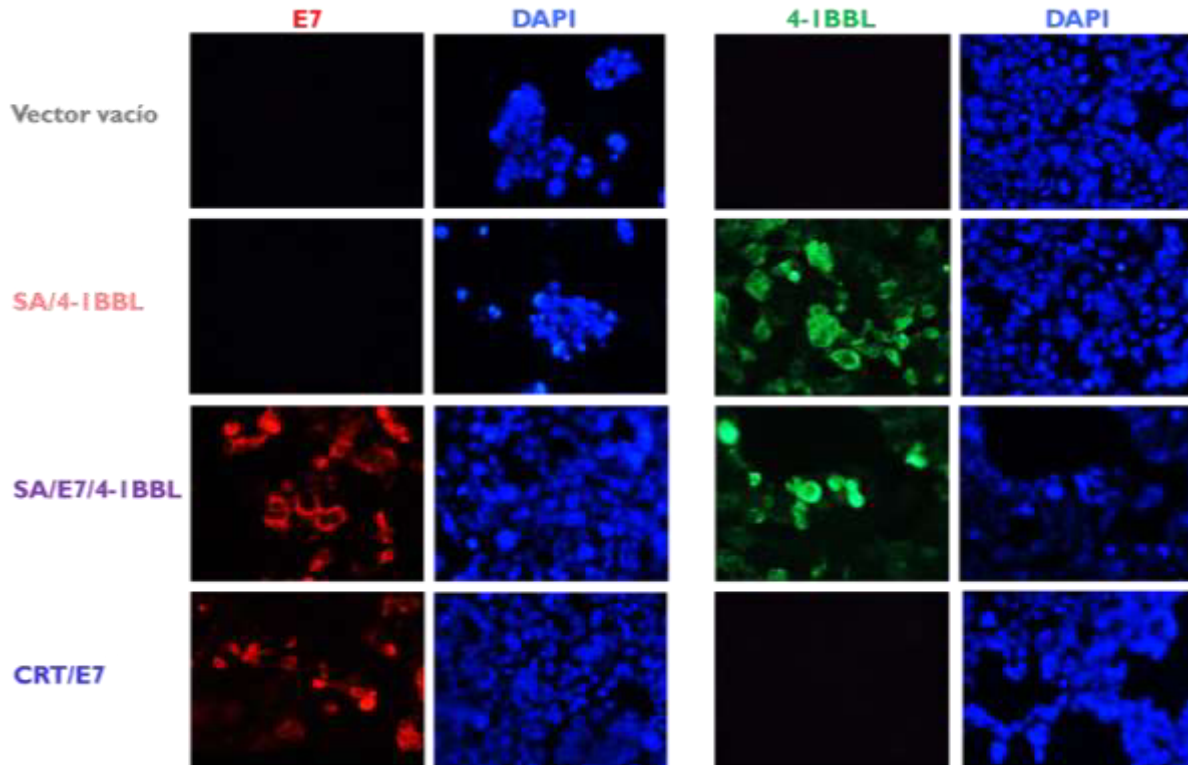


Figura 14. Detección de la expresión de las proteínas E7 y 4-1BBL mediante inmunofluorescencia. Células HEK-293 se transfectaron con las diferentes fusiones correspondientes, se fijaron y se incubaron con anticuerpos anti-E7 y anti-4-1BBL y se detectaron con anticuerpos secundarios marcados con CF594 (rojo) para E7 y FITC (verde) para 4-1BBL. Se utilizó DAPI (azul) para teñir los núcleos. Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia (LSM 710, Carl Zeiss) al objetivo 40X.

LA FUSIÓN GÉNICA SA/E7/4-1BBL INDUJO PROTECCIÓN CONTRA EL DESARROLLO DE TUMORES QUE EXPRESAN E7.

Para evaluar si se induce una protección contra el desarrollo de tumores que expresan E7, se realizó un ensayo profiláctico en el que se utilizaron 4 grupos de ratones, los cuales fueron inmunizados con pUMVC4a, SA/4-1BBL, SA/E7/4-1BBL y CRT/E7 y posteriormente retados con células tumorales TC-1, para finalmente graficar el volumen del tumor.

Como resultados se muestra la siguiente gráfica (figura 15), en donde se puede observar en el eje de la Y el volumen del tumor contra el tiempo en el eje de la X, en la que se compara nuestro control negativo, SA/4-1BBL, SA/E7/4-1BBL y CRT/E7. Se puede observar que los ratones que fueron inmunizados con las construcciones que no contienen E7 como nuestro control negativo y SA/4-1BBL presentaron un mayor desarrollo del tumor respecto al tiempo, mientras que los que fueron inmunizados con nuestro control positivo presentaron un bloqueo del desarrollo tumoral y los que fueron inmunizados con SA/E7/4-1BBL no desarrollaron tumores y no se observó una diferencia significativa entre estos durante el periodo en el que fueron observados. Se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las construcciones que no contienen E7 (Vector vacío y SA/4-1BBL) y las que sí contienen E7 (CRT/E7 y SA/E7/4-1BBL) en el día 18.

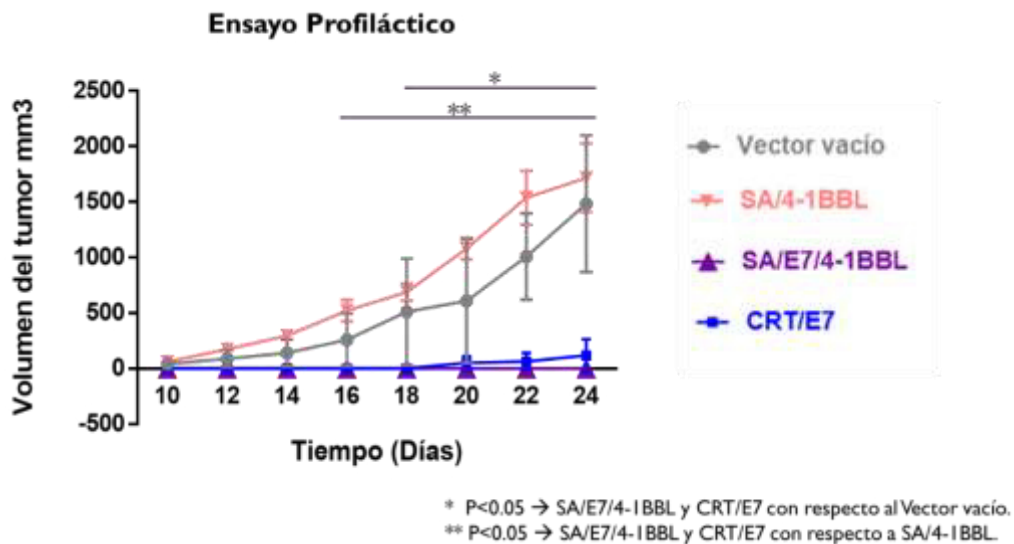


Figura 15. Efecto antitumoral de las construcciones en un ensayo profiláctico. Los ratones fueron inmunizados con las diferentes fusiones utilizando el sistema de biobalística y posteriormente se les implantaron células tumorales de manera subcutánea para analizar el efecto antitumoral graficando el volumen del tumor.

LA FUSIÓN GÉNICA SA/E7/4-1BBL PRESENTA UN EFECTO ANTITUMORAL EN UN ENSAYO TERAPÉUTICO.

Para evaluar el efecto antitumoral en un ensayo terapéutico, se utilizaron 4 grupos de ratones, los cuales fueron retados con células tumorales TC-1, posteriormente inmunizados con pUMVC4a, CRT/E7, SA/4-1BBL y SA/E7/4-1BBL, para finalmente tomar las mediciones del tumor.

Como resultados se muestra la siguiente gráfica (figura 16), en donde se puede observar en el eje de la Y el volumen del tumor contra el tiempo en el eje de la X, observando un patrón similar al ensayo profiláctico, en donde los ratones que fueron inmunizados con las construcciones que no contienen E7 como nuestro control negativo y SA/4-1BBL presentaron un mayor desarrollo del tumor respecto al tiempo, mientras que los que fueron inmunizados con nuestro control positivo y nuestra construcción de interés presentaron un menor desarrollo del tumor y se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre éstos a partir del día 22, así como una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las construcciones que no contienen E7 (Vector vacío y SA/4-1BBL) y las que si contienen E7 (CRT/E7 y SA/E7/4-1BBL) en el día 18. Por lo tanto, en este ensayo terapéutico los ratones inmunizados con SA/E7/4/1BBL mostraron un mejor efecto antitumoral en comparación con los ratones inmunizados con el sistema CRT/E7.

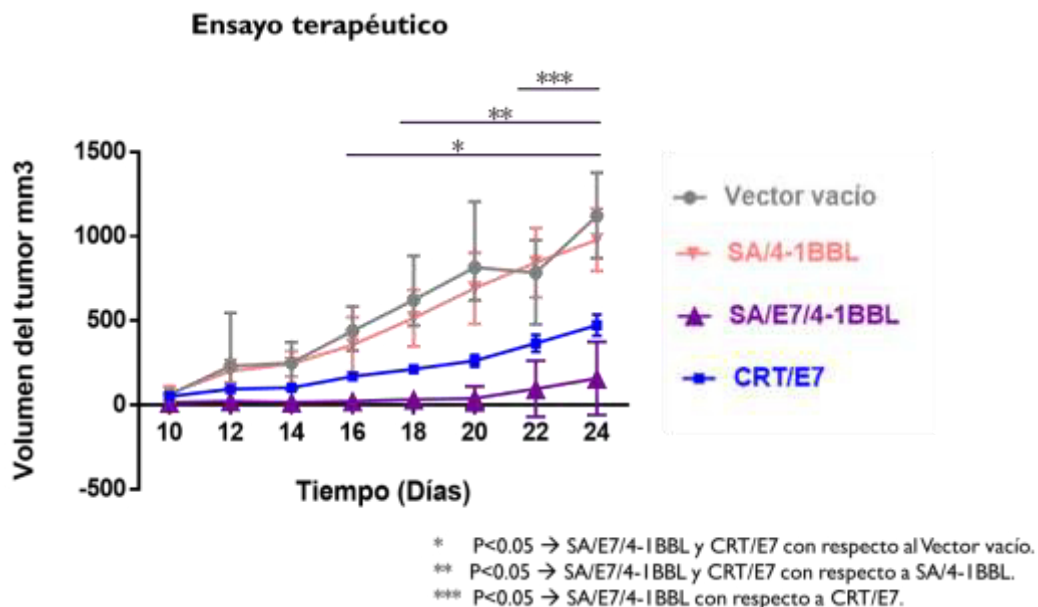


Figura 16. Efecto antitumoral de las construcciones en un ensayo terapéutico. A los ratones se les implantaron células tumorales de manera subcutánea y posteriormente fueron inmunizados con las diferentes construcciones utilizando el sistema de biobalística para analizar el efecto antitumoral graficando el volumen del tumor.

Finalmente se graficó la supervivencia (figura 17), en donde se puede observar en el eje de la Y el porcentaje de supervivencia contra el tiempo en el eje de la X, en la que se puede observar que los ratones que fueron inmunizados con las construcciones que no contienen E7 como nuestro control negativo y SA/4-1BBL no lograron sobrevivir, los ratones inmunizados con nuestro control positivo presentaron una supervivencia del 50% y los ratones inmunizados SA/E7/4-1BBL presentaron una supervivencia del 100% durante el periodo de tiempo observados.

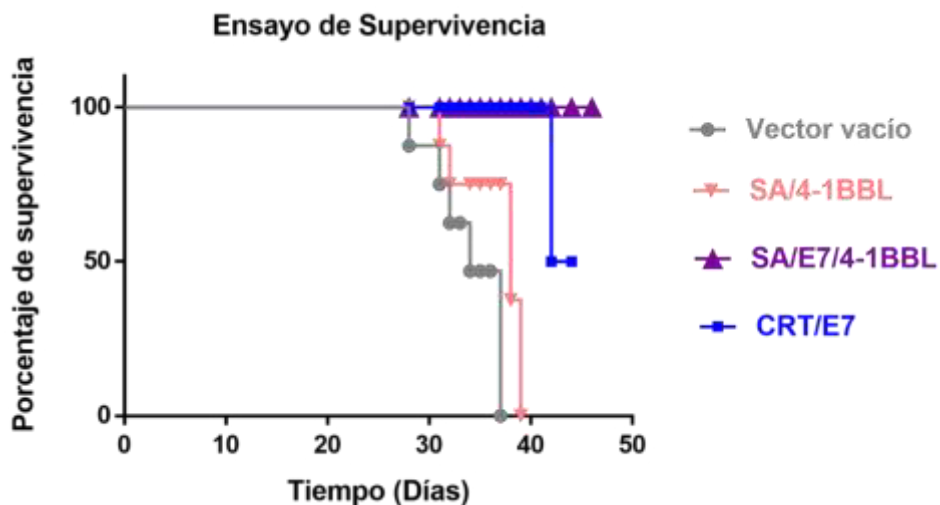


Figura 17. Supervivencia de los ratones inmunizados con las fusiones génicas en un ensayo terapéutico. Los ratones fueron retados con células tumorales y posteriormente fueron inmunizados con las diferentes construcciones, para graficar la supervivencia de estos y de esta manera determinar cuáles sobrevivieron al desarrollo de tumores que expresan E7.

Los resultados anteriores nos indican que la inmunización con la construcción SA/E7/4-1BBL es capaz de generar una respuesta antitumoral terapéutica superior a la obtenida por CRT/E7, indicando que el uso del adyuvante SA/4-1BBL mejora la respuesta inmune contra los antígenos expresados en los tumores.

DISCUSIÓN

El cáncer cérvico uterino, por sus elevadas tasas de mortalidad y morbilidad, representa uno de los principales problemas de salud pública en el país, por lo que demanda una intervención prioritaria. Se han desarrollado diferentes métodos físicos y químicos de tratamiento, entre estos podemos mencionar a la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la crioterapia con sus respectivas variantes o adaptaciones (Sellors et al., 2003). En la mayoría de los casos estos tratamientos provocan una serie de reacciones secundarias peligrosas que dañan al paciente y aunado a esto, en un buen porcentaje de los casos no se logra resolver el problema y las pacientes recaen.

Debido a las deficiencias de las terapias existentes para combatir el CaCu, en la actualidad se ha optado por recurrir a una nueva generación de tratamientos basados en Terapia Génica (Jinoch et al., 2003). Por ejemplo, la aplicación del gen E7 del VPH-16 a pesar de inducir respuestas inmunes celulares y humorales, es un pobre inmunógeno y no es eficaz como vacuna terapéutica de cáncer (Sharma et al., 2010). Por lo anterior, E7 se ha utilizado en combinación con moléculas adyuvantes que estimulan el sistema inmunológico, como lo es el ligando 4-1BBL.

Una gran ventaja de este ligando en forma de tetrámero conjugado con E7, es que tiene un efecto pleiotrópico y por ello induce diversos efectos sobre el sistema inmune (Futagawa et al., 2002; Myers et al., 2006; Robertson et al., 2008), como son el dirigir antígenos *in vivo* a células dendríticas, incrementando la presentación cruzada y la activación de las células T, así como el establecimiento de memoria a largo plazo; se ha demostrado su eficacia terapéutica en tres modelos diferentes de tumores (Sharma et al., 2010). La estreptavidina ha jugado un papel importante en este efecto del 4-1BBL, ya que le confiere la propiedad de formar tetrámeros para incrementar transducción de señales a través del receptor 4-1BB, el cual existe como un trímero en su forma activa de manera natural (Rabu et al., 2005). Por lo tanto, SA-4-1BBL representa un adyuvante efectivo para el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer e infecciones crónicas (Sharma, Yolcu & Shirwan, 2014).

Generar los complejos proteicos implica construir un gen del adyuvante SA/4-1BBL que porte la información de estos dos polipéptidos, después transfectar células de *Drosophila* para que expresen las proteínas correspondientes y finalmente purificarlas; por otro lado se transforman bacterias con E7 para que expresen las proteínas de interés, las purifican y se añade un paso extra que consiste en biotinar dichas proteínas para finalmente conjugar estos antígenos biotinilados a SA-4-1BBL y

de esta manera formar los complejos proteicos. Como vemos es muy laborioso el sistema e implica manejar dos diferentes genes, en dos diferentes organismos y luego conjugar dichas proteínas. Debido a lo anterior en este trabajo se simplificó el sistema de complejos proteicos construyendo por primera vez una fusión génica conteniendo tanto la molécula adyuvante SA-4-1BBL como el antígeno E7 del HPV-16 y se evaluó su efecto antitumoral en un modelo animal de cáncer cérvico uterino que expresa como antígeno la proteína E7.

Analizando diferentes mecanismos de inmunización probados para terapia génica antitumoral, se encuentran: inmunización con péptidos o proteínas, con vectores adenovirales, con ADN desnudo, con células completas, o con el uso combinado de algunas de ellas. De éstas, la inmunización con partículas cargadas de ADN resultan ser seguras, estables y relativamente fácil y económicas de producir y éstas pueden ser administradas por diferentes técnicas como la biobalística o electroporación (Mota, 2009). En el presente proyecto se utilizó el sistema de biobalística (Bio-Rad Helios GenGun) como método de inmunización, debido a que su aplicación en piel estimula las células dendríticas, las cuales son células presentadoras de antígenos profesionales que participan activamente en la respuesta inmune específica.

El diseño de nuestra construcción de interés SA/E7/41BBL, se basó en los complejos proteicos, por lo que se decidió mantener en el extremo carboxilo el dominio extracelular del 4-1BBL, en el extremo amino la estreptavidina (SA) y se colocó E7 entre SA y 4-1BBL, flanqueada por linkers, los cuales permiten conservar la estructura y función de cada elemento.

Para evaluar esta fusión génica, se comparó contra el sistema de CRT/E7 como control positivo, el cual ya había sido probado en nuestro laboratorio demostrado un eficiente efecto antitumoral (Pérez et al., 2017)

Se corroboró el diseño de nuestras construcciones mediante la caracterización de éstas, con las enzimas *SaI*I y *Bg*III, obteniendo las bandas esperadas del inserto. Además, se utilizó la enzima *Nhe*I obteniendo la banda esperada correspondiente a la proteína E7 de nuestra construcción de interés.

Además, para comprobar que las fusiones génicas realmente expresaban las proteínas correspondientes se utilizó western blot e inmunofluorescencia. Para la detección de E7 mediante western blot de las construcciones CRT/E7 y SA/E7/4-1BBL se utilizaron anticuerpos E7 específicos, es importante recordar que dichas construcciones son fusiones génicas, por lo que la detección de la banda es aún mayor a lo reportado con los complejos proteicos (Sharma et al., 2010). Para la

detección del 4-1BBL mediante inmunofluorescencia, se detectó la señal positiva de ésta, localizada en el RE alrededor de los núcleos tanto para nuestra construcción de interés como SA/4-1BBL, debido al péptido señal que se añadió a su secuencia permitiendo que dicha proteína sea secretada y pueda unirse a su receptor expresado en células dendríticas. Esto concuerda con lo reportado en los complejos proteicos por Sharma y colaboradores, en donde demostraron que la señal de esta proteína se encontraba en el RE de las células dendríticas, las cuales expresan de manera constitutiva el receptor 4-1BB (Sharma et al., 2010).

En los ensayos *in vivo* se corroboró que la inmunización utilizando la fusión génica SA/E7/4-1BBL fue capaz de generar un efecto antitumoral similar o mayor al reportado con el sistema de CRT/E7 tanto en un ensayo profiláctico como terapéutico (Pérez et al., 2017). Obteniendo en ambos ensayos que los ratones que fueron inmunizados con las construcciones que contienen E7, como nuestro control positivo y nuestra construcción de interés, presentaron un menor volumen del tumor, en comparación con los ratones que fueron inmunizados con las construcciones que no contienen E7. En el ensayo profiláctico se obtuvo que dicha fusión génica fue capaz de retardar el crecimiento tumoral en mayor medida en comparación con CRT/E7 sin presentar una diferencia significativa, mientras que en el ensayo terapéutico se obtuvo una diferencia significativa de nuestra construcción de interés con el sistema CRT/E7, ya que los ratones inmunizados con SA/E7/4-1BBL no desarrollaron tumores.

Finalmente se obtuvo un aumento en la supervivencia de los ratones que fueron inmunizados con SA/E7/4-1BBL (100%) con respecto a los que fueron inmunizados CRT/E7 (50%) durante el periodo de tiempo en que éstos fueron observados. Por otro lado, también se demostró que el porcentaje de supervivencia en los ratones inmunizados con SA/E7/4-1BBL fue el mismo al reportado con los complejos proteicos en un ensayo terapéutico (Sharma et al., 2010).

Estos resultados representan un gran avance en el uso del adyuvante 4-1BBL, al hacer más simple su preparación y potenciar la respuesta inmune antitumoral, con la finalidad que sean efectivas en la generación de una respuesta inmune citotóxica capaz de eliminar las células infectadas y malignizadas y que, además, tras la resolución, sean capaces de generar una respuesta inmune de memoria eficaz, sirviendo como base para la elaboración de una vacuna terapéutica contra el cáncer cérvico uterino, u otros cánceres que expresen diferentes antígenos.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló un sistema simplificado de los complejos proteicos basado en la fusión génica del adyuvante SA-4-1BBL al antígeno E7.
- En este trabajo se reporta por primera vez la respuesta antitumoral generada por la inmunización con la fusión génica SA/E7/4-1BBL
- El sistema desarrollado presentó un mayor efecto antitumoral que el obtenido con el sistema de CRT/E7 y similar al a lo que se ha reportado en diversos artículos con los complejos proteicos.
- Este sistema se puede aplicar en el diseño de vacunas para diferentes tipos de cáncer que expresen diferentes antígenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman & S. Pillai. (2008). *Inmunología celular y molecular*. 6ta edición. Editorial. Elsevier
- Alderson, M. R., Smith, C. A., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Armitage, R. J., Falk, B., ... Din, W. S. (1994). Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Eur J Immunol*, 24(9), 2219–2227. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240943>
- Alfaro, C., Murillo, O., Tirapu, I., Azpilicueta, A., Huarte, E., Arina, A., ... Melero, I. (2006). El potencial de la inmunomodulación con anticuerpos monoclonales anti-CD137 (4-1BB) para terapia de enfermedades malignas e infecciones virales crónicas. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 29(1), 77–96.
- Chakrabarti, O., & Krishna, S. (2003). Molecular interactions of “high risk” human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *Journal of Biosciences*, 28(3), 337–348.
- Chen, L. P., Thomas, E. K., Hu, S. L., Hellström, I., & Hellström, K. E. (1991). Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(1), 110–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.1.110>
- Cooper, G & R. Hausman. (2010). *La célula*. 5ta edición. Editorial Marbán.
- Elpek, K. G., Yolcu, E. S., Franke, D. D. H., Lacelle, C., Schabowsky, R.-H., & Shirwan, H. (2007). Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *Journal of Immunology*, 179(11), 7295–7304. <https://doi.org/10.1093/immk/179/11/7295> [pii]
- Ganesh Suntharalingam, F.R.C.A., Meghan R. Perry, M.R.C.P., Stephen Ward, F.R.C.A., Stephen J. Brett, M.D., Andrew Castello-Cortes, F.R.C.A., Michael D. Brunner, F.R.C.A., and Nicki Panoskaltsis, M.D., P. D. (2006). Cytokine Storm in a Phase 1 Trial of the Anti-CD28 Monoclonal Antibody TGN1412. *The New England Journal of Medicine*, 355:1018-28.
- Goodwin, R. G., Din, W. S., Davis-Smith, T., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Sato, T. A., ... Smith, C. A. (1993). Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging

- family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *European Journal of Immunology*, 23(10), 2631–2641. <https://doi.org/10.1002/eji.1830231037>
- Gruss, H. J., & Dower, S. K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*, 85(12), 3378–404.
- Guinn, B. a, DeBenedette, M. a, Watts, T. H., & Berinstein, N. L. (1999). 4-1BBL cooperates with B7-1 and B7-2 in converting a B cell lymphoma cell line into a long-lasting antitumor vaccine. *Journal of Immunology*, 162(8), 5003–10.
- Hidalgo-Martínez, A. (2006). El Cáncer Cérvicouterino, su impacto en México y el por qué no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Rev Biomed*, 17(5), 81–84.
- Jinoch, P., Zak, R., Janouskova, O., Kunke, D., Rittich, S., Duskova, M., ... Vonka, V. (2003). Immunization with live HPV-16-transformed mouse cells expressing the herpes simplex thymidine kinase and either GM-CSF or IL-2. *International Journal of Oncology*, 23(3), 775–783.
- Kindt, T, R. Goldsby & B. Osborne. (2007). *Inmunologia de Kubby*. 6ta. edicion. Editorial Mc. Graw Hill
- Kober, J., Leitner, J., Klauser, C., Woitek, R., Majdic, O., Stöckl, J., ... Steinberger, P. (2008). UKPMC Funders Group. *October*, 38(10), 2678–2688. <https://doi.org/10.1002/eji.200838250>.The
- Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. H., & Halaban, R. (1987). Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7473–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7473>
- Kwon, B. S., & Weissman, S. M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(6), 1963–7.
- Liu, X., Clements, A., Zhao, K., & Marmorstein, R. (2006). Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), 578–586. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508455200>

- Melero, I., Bach, N., Hellström, K. E., Aruffo, A., Mittler, R. S., & Chen, L. (1998). Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: Synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *European Journal of Immunology*, *28*(3), 1116–1121. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199803\)28:03<1116::AID-IMMU1116>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199803)28:03<1116::AID-IMMU1116>3.0.CO;2-A)
- Melero, I., Murillo, O., Dubrot, J., Hervás-Stubbs, S., & Perez-Gracia, J. L. (2008). Multi-layered action mechanisms of CD137 (4-1BB)-targeted immunotherapies. *Trends in Pharmacological Sciences*, *29*(8), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.005>
- Melero, I., Shuford, W. W., Newby, S. A., Aruffo, A., Ledbetter, J. A., Hellström, K. E., ... Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nature Medicine*, *3*(6), 682–5. <https://doi.org/10.1038/nm0697-682>
- Mota-Sánchez, J. (2009). Vacunas de ADN: Inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Publica de Mexico*, *51*(SUPPL.3), 463–469. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000900012>
- Myers, L., Lee, S. W., Rossi, R. J., Lefrancois, L., Kwon, B. S., Mittler, R. S., ... Vella, A. T. (2006). Combined CD137 (4-1BB) and adjuvant therapy generates a developing pool of peptide-specific CD8 memory T cells. *International Immunology*, *18*(2), 325–333. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh371>
- Novellino, L., Castelli, C., & Parmiani, G. (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *54*(3), 187–207. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0560-6>
- Ortega-cervantes, L., Aguilar-lemarroy, A., Rojas-garcía, A. E., Barrón-vivanco, B. S., Vallejo-ruiz, V., León, D. C., ... Medina, M. (2016). Intraepithelial lesions and cervical cancer, *10*(3).
- Perez-Trujillo, J. J., Garza-Morales, R., Barron-Cantu, J. A., Figueroa-Parra, G., Garcia-Garcia, A., Rodriguez-Rocha, H., ... Loera-Arias, M. D. J. (2017). DNA vaccine encoding human papillomavirus antigens flanked by a signal peptide and a KDEL sequence induces a potent therapeutic antitumor effect. *Oncology Letters*, *13*(3), 1569–1574. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5635>

- Rabu, C., Quéméner, A., Jacques, Y., Echasserieau, K., Vusio, P., & Lang, F. (2005). Production of recombinant human trimeric CD137L (4-1BBL): Cross-linking is essential to its T cell co-stimulation activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41472–41481. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506881200>
- Rajesh K. Sharma, Esma S. Yolcu, and H. S. (2014). SA-4-1BBL as a Novel Adjuvant for the Development of Therapeutic Cancer Vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 13(3), 387–398. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.880340>
- Robertson, S. J., Messer, R. J., Carmody, A. B., Mittler, R. S., Burlak, C., & Hasenkrug, K. J. (2008). CD137 costimulation of CD8+ T cells confers resistance to suppression by virus-induced regulatory T cells. *J Immunol*, 180(8), 5267–5274. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5267>
- Rudolph, S. E., Lorincz, A., Wheeler, C. M., Gravitt, P., Lazcano-Ponce, E., Torres-Ibarra, L., ... Salmerón, J. (2016). Population-based prevalence of cervical infection with human papillomavirus genotypes 16 and 18 and other high risk types in Tlaxcala, Mexico. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 461. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1782-x>
- Sarmiento-rubiano, L. A. (2015). Antígenos asociados a tumores y su potencial uso en el tratamiento del cáncer Tumor associated antigens and its potential use in cancer therapy, 31(1), 118–137. <https://doi.org/http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v31n1/v31n1a13.pdf>
- Schabowsky, R. H., Elpek, K. G., Madireddi, S., Sharma, R. K., Yolcu, E. S., Bandura-Morgan, L., ... Shirwan, H. (2009). A novel form of 4-1BBL has better immunomodulatory activity than an agonistic anti-4-1BB Ab without Ab-associated severe toxicity. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.127>
- Secretaría de Salud. (2006). Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer cervico uterino. *Diario Oficial de La Federación*, 52, 52–70.
- Sellors, J., Lewis, K., Kidula, N., Muhombe, K., Tsu, V., & Herdman, C. (2003). Screening and Management of precancerous Lesions To Prevent: Cervical Cancer in Low-Resource Settings. *Asian Pacific Journal of*

Cancer Prevention, 4(3), 277–280.

- Sharma, R. K., Elpek, K. G., Yolcu, E. S., Schabowsky, R. H., Zhao, H., Bandura-Morgan, L., & Shirwan, H. (2009). Costimulation as a platform for the development of vaccines: A peptide-based vaccine containing a novel form of 4-1BB ligand eradicates established tumors. *Cancer Research*, 69(10), 4319–4326. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3141>
- Sharma, R. K., Schabowsky, R.-H., Srivastava, A. K., Elpek, K. G., Madireddi, S., Zhao, H., ... Shirwan, and H. (2010). 4-1BB ligand as an effective multifunctional immunomodulator and antigen delivery vehicle for the development of therapeutic cancer vaccines. *NIH Public Access*, 70(10), 3945–3954. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4480.4-1BB>
- Sharma, R. K., Srivastava, A. K., Yolcu, E. S., MacLeod, K. J., Schabowsky, R. H., Madireddi, S., & Shirwan, H. (2010). SA-4-1BBL as the immunomodulatory component of a HPV-16 E7 protein based vaccine shows robust therapeutic efficacy in a mouse cervical cancer model. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.073>
- Sharma, R., Yolcu, E., Elpek, K., & Shirwan, H. (2010). Tumor cells engineered to codisplay on their surface 4-1BBL and LIGHT costimulatory proteins as a novel vaccine approach for cancer immunotherapy. *Cancer Gene Therapy*, 17, 730–741. <https://doi.org/10.1038/cgt>
- Shuford, W. W., Klussman, K., Tritchler, D. D., Loo, D. T., Chalupny, J., Siadak, A. W., ... Mittler, R. S. (1997). 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(1), 47–55. <https://doi.org/10.1084/jem.186.1.47>
- Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., ... Goodwin, R. G. (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science*, 248(4958), 1019–23. <https://doi.org/10.1126/science.2160731>
- Stanley, M. (2006). Immune responses to human papillomavirus, 1(September 2005), 16–22.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.002>

Toshiro Futagawa, Hisaya Akiba, Tomohiro Kodama, Kazuyoshi Takeda, Yasuyuki Hosoda, H. Y. & K. O.

(2002). Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *International Immunology*, 14(3), 275–286.

Velásquez-Torres, M. T., & Jiménez-Acosta, A. G. (2016). Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.

Escuela Nacional de Medicina Y Homeopatía, 1(1), 1–8.

Vignerón, N. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed Research International*,

2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/948501>

Wilcox, R. A., Tamada, K., Flies, D. B., Zhu, G., Chapoval, A. I., Blazar, B. R., ... Chen, L. (2004). Ligation of

CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo.

Blood, 103(1), 177–184. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2184>

Wilcox, R. a, Chapoval, A. I., Gorski, K. S., Otsuji, M., Shin, T., Flies, D. B., ... Chen, L. (2002). Cutting edge:

Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. :*

1950), 168(9), 4262–4267. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4262>

Won, E. Y., Cha, K., Byun, J. S., Kim, D. U., Shin, S., Ahn, B., ... Cho, H. S. (2010). The structure of the trimer of

human 4-1BB ligand is unique among members of the tumor necrosis factor superfamily. *Journal of*

Biological Chemistry, 285(12), 9202–9210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.084442>

Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T. C., & Hung, C.-F. (2014). DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Human*

Vaccines & Immunotherapeutics, 10(11), 3153–64. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.980686>