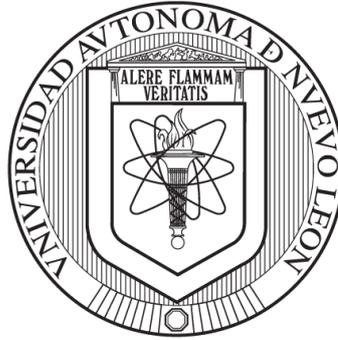


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“Evaluación del efecto antitumoral del antígeno E7 del VPH-16
fusionado a la proteína COX-2”**

Presenta:

BIÓL. DAVID HERNÁN MARTÍNEZ PUENTE

**Como requisito parcial para obtener el título de
Maestría en Ciencias con Orientación en Morfología**

Monterrey, N. L.

Julio 2018

**“Evaluación del efecto antitumoral del antígeno E7 del VPH-16
fusionado a la proteína COX-2”.**

Aprobación de Tesis:



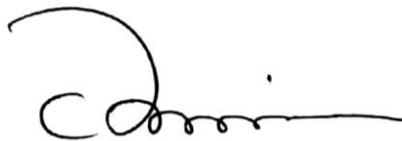
Dra. María de Jesús Loera Arias
Director



Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Co-Director



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Comisión de Tesis



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

**“Evaluación del efecto antitumoral del antígeno E7 del VPH-16
fusionado a la proteína COX-2”**

Presentado por

Biól. David Hernán Martínez Puente

Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Biología Celular y Molecular del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Genética Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. María de Jesús Loera Arias y la co-dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas.



Dra. María de Jesús Loera Arias

Director



Dra. Odila Saucedo Cárdenas

Co-Director

Este trabajo fue financiado por el fondo SEP-CONACYT y la beca No. 780375, además del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

DEDICATORIA

Como todas las buenas experiencias en mi vida personal y profesional... a mi madre, de quien estaré eternamente agradecido por los valores que me inculco, y los sacrificios que ha hecho por mí.

A mis seres queridos y a todas aquellas personas que han sufrido por causa del cáncer. Pues son el motor constante que inspiran a desarrollar nuevas estrategias para combatir estas enfermedades.

A los murinos que nos permiten ampliar las fronteras del conocimiento para el progreso de las ciencias de la salud.

"El amor por todas las criaturas vivientes es el más noble atributo del hombre".

Charles Darwin

AGRADECIMIENTOS

Nuevamente y con mucho gusto... A la Dra. María de Jesús Loera Arias, por seguir brindándome su amistad y consejos durante estos 4 años, desde mi servicio social hasta mi maestría. Por permitirme desarrollarme en el ámbito de las ciencias con todo el conocimiento que me ha aportado y encaminarme por una de las ciencias más hermosas que existen, además, por tolerar mis mil preguntas y distracciones.

Al Dr. Roberto Montes y a la Dra. Odila Saucedo, por tener el tiempo y la paciencia de revisar este proyecto, y aportar con su gran experiencia al desarrollo de este.

Al Dr. Humberto Rodríguez y a la Dra. Aracely, por inculcar su minucioso análisis experimental.

Al Dr. Arnulfo Olivo y al Dr. Adolfo Soto, por su apoyo moral y experiencias compartidas.

A la Dra. Libertad Leal y a la Dra. Yolanda Gutiérrez, por su apoyo en esculpir mi desarrollo profesional.

A Ana Duarte por las pláticas de ciencia donde la retroalimentación ayudaba a comprender y entender mejor nuestros proyectos.

A mis hermanos Marcelo Martínez y Alejandro Martínez, por el hecho de compartir los mismos gustos por la astronomía, esas desveladas de astrofotografía como hobby en un sábado cualquiera. Fueron mis momentos de relax, cuando sentía que me agobiaba el estrés.

A mis amigos de laboratorio a los que siguen y a los que ya no están, pero seguimos en contacto: José Juan Pérez, Daniel Salas, Rodolfo Garza, Abigail Robles, Alejandro González, Alejandra Martínez, Leyla Sánchez, Abigail Torres, Sheila Villa, Elvis Jaramillo, Alberto Barrón, Gabriel Figueroa, Juan Castillo, Daniel Matta, Jorge Sepúlveda, Estefanía Ramírez por brindarme su compañerismo, consejos, apoyo y esa gran amistad durante este periodo de tiempo, en el desarrollo de este trabajo y fuera del ámbito académico.

A mis compañeros y amigos de generación, quienes estuvieron en los buenos y malos momentos siempre con un apoyo incondicional: Marcos Arroyo, Jaudiel Salado, Alfredo González, Erick García, Jared Acosta, Xico Acosta.

Nuevamente a mis amigos de generación de la Facultad de Ciencias Biológicas: Hugo David López, Alan Galarza, Pablo Ramírez y Brando David Muraira, por estos 8 años y contando de nuestra gran hermandad "Las Señoras".

A mis amigos de la infancia: Esteban Franco, Luis Rodríguez, Julio González Ricardo Sánchez, Diego Herrera y Saul Jiménez que pese a que pase el tiempo sé que contamos los unos con los otros.

A TODOS... ¡GRACIAS!

CONTENIDO TEMÁTICO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
Cáncer cervicouterino	4
Virus del Papiloma Humano 16	4
Proteína E7	5
Respuesta Inmune celular y humoral en la infección por VPH	6
Terapia génica.....	7
Chaperonas.....	9
Calreticulina.....	10
Estrategias para estimular una respuesta inmune antitumoral	11
El retículo endoplásmico	12
Sistema de degradación asociado al retículo endoplásmico	15
Cicloxigenasa	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIAL Y EQUIPO	23
Línea celular.....	23
Bacterias.....	23
Enzimas	23
Plásmidos	24
Anticuerpos	24
Cultivo bacteriano.....	25
Cultivo celular	25
Reactivos	25
Soluciones.....	26
Material.....	27
Equipo	28

METODOLOGÍA	29
Consideraciones éticas y de bioseguridad	29
Bacterias	30
Líneas celulares	30
Ratones	31
Criterios de Punto Final	32
Eutanasia	33
Diseño y construcción de los plásmidos	33
Análisis de expresión de proteínas de interés	37
Análisis de localización subcelular de las proteínas recombinantes	38
Determinación de la vida media de las proteínas de interés	39
Biobalística	40
Ensayo profiláctico	40
Ensayo terapéutico	41
Análisis estadístico	41
RESULTADOS	42
Caracterización de los plásmidos	42
Análisis de la expresión de los plásmidos	44
Localización subcelular de las proteínas de fusión y activación de la respuesta a estrés en RE	45
Vida media de COX2-E7	48
Análisis del efecto profiláctico y terapéutico	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	57
LITERATURA CITADA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la proteína E7 del VPH-16.	6
Figura 2. Terapia génica.	8
Figura 3. Función de las chaperonas.	10
Figura 4. Estructura de la calreticulina.	11
Figura 5. Respuesta a proteínas mal plegadas.	14
Figura 6. Presentación de antígenos.	15
Figura 7. Mecanismos de la regulación de proteínas en el RE.	17
Figura 8. Degradación asociada a retículo endoplásmico.	18
Figura 9. Estructura de las proteínas COX-1 y COX-2.	19
Figura 10. Diseño y estructura de la construcción con las proteínas COX-2 murina, E7 y la señal de retención de la calreticulina KDEL.	35
Figura 11. Diseño y estructura de la construcción con las proteínas COX-2 murina, E7 y la señal de retención de la calreticulina KDEL, con la delección de ERAD.	36
Figura 12. Estructura de la construcción con la proteína COX-2 murina, y la señal de retención de la calreticulina KDEL.	37
Figura 13. Esquema de ensayo profiláctico.	40
Figura 14. Esquema de ensayo terapéutico.	41
Figura 15. Caracterización de las construcciones de interés in silico e in vitro.	43
Figura 16. Curva de expresión de las construcciones COX2-E7 y COX2ΔERAD a través del tiempo.	44
Figura 17. Detección de las proteínas recombinantes.	45
Figura 18. Análisis de la expresión y localización de las construcciones en el retículo endoplásmico.	47
Figura 19. Vida media de COX2-E7.	48
Figura 20. Ensayos profilácticos.	50
Figura 21. Ensayos Terapéuticos.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos utilizados para la expresión de las proteínas de interés.24

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para el análisis de las proteínas de interés.24

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATF6	Factor activador de transcripción 6 (Activating Transcription Factor 6)
GRP78/BiP	Proteína Regulada por Glucosa de 78 kDa/ Proteína de Unión a Inmunoglobulina (78 kDa glucose-regulated protein/ Binding immunoglobulin protein)
°C	grados Celsius
CaCu	Cáncer cérvicouterino
CL	Células de Langerhan's
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dubelcco (Dubelcco's Eagle Modified Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERAD	Degradación Asociada al Retículo Endoplásmico (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation)
h	Horas
Hsp	Proteínas de choque térmico (Heat shock proteins)
IFN- γ	Interferón gamma
IL-2	Interleucina 2
IRE-1	Enzima que requiere de Inositol-1 (Inositol-requiring enzyme 1)
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (Mucosa-associated lymphoid tissue)
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)
μ g	Microgramos
mg	Miligramos
ml	Mililitros
ng	Nanogramos

NK	Natural killer
pb	Pares de bases
PBS	Buffer Fosfato Salino (Phosphate-buffered saline)
PERK	Proteína Quinasa de Retículo Endoplásmico (Protein Endoplasmic Reticulum Kinase)
pRb	Proteína de retinoblastoma
PVDF	Polifluoruro de vinilideno (Polyvinylidene fluoride)
RE	Retículo endoplásmico (Endoplasmic Reticulum)
TBST	Buffer Tris Salino con Tween (Tris Buffered Saline with Tween)
TCR	Receptor de linfocitos T (T Cell Receptor)
TSA	Antígenos Específicos de Tumor (Tumor Specific Antigen)
UPR	Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (Unfolded Protein Response)
VPH	Virus del Papiloma Humano
Wb	Western blot
%	Porcentaje

RESUMEN

Biól. David Hernán Martínez Puente.
Universidad de Nuevo León
Facultad de Medicina.

Fecha de titulación: Julio 2018

Título del estudio: “Evaluación del efecto antitumoral del antígeno E7 del VPH-16 fusionado a la proteína COX-2”

Páginas en el estudio: 74

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Morfología

Área de estudio: Morfología

Propósito y método de estudio: En este proyecto nos enfocamos en evaluar el efecto antitumoral del antígeno E7 del VPH-16 fusionado a la proteína COX-2. Las construcciones realizadas fueron COX2-E7, COX2 y COX2-E7 Δ ERAD; estas últimas fueron utilizadas como controles para evaluar la importancia de E7 y del casete de degradación de 19 aminoácidos de la COX-2. Una vez diseñadas y sintetizadas las construcciones, estas fueron caracterizadas por digestión enzimática a través de enzimas de restricción específicas, también se realizó una caracterización por western blot para evaluar que efectivamente fueran capaces de dirigir la expresión de las proteínas de fusión del tamaño esperado. También se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para evaluar la localización subcelular de las proteínas de fusión y si estas inducen una respuesta de estrés en retículo endoplásmico. Por último, se realizaron ensayos de terapia génica *in vivo* mediante la técnica de biobalística en un modelo murino de cáncer cervicouterino. Para ello, ratones de la cepa C57BL/6 fueron inoculados con la línea celular TC1 de manera subcutánea en el costado izquierdo, tanto en ensayos profilácticos como terapéuticos utilizando como control la construcción CRT-E7, la cual posee un efecto antitumoral bien caracterizado.

Conclusiones y contribuciones: En este proyecto demostramos que las construcciones que contienen la proteína COX-2 son dirigidas al retículo endoplásmico. Además, aquellas construcciones que cuentan con el antígeno E7, activan una respuesta a estrés en el retículo endoplásmico y que las construcciones que contienen el antígeno dirigido a este organelo son tan eficientes como el control CRT-E7. Esta estrategia podría ser utilizada probando otro tipo de antígenos poco inmunogénicos para evaluar su potencial para despertar respuestas específicas.

Dra. María de Jesús Loera Arias
Director de Tesis

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha trabajado arduamente en el desarrollo de una vacuna antitumoral contra el cáncer cervicouterino (CaCu), debido a que en la actualidad sólo existen vacunas preventivas contra esta enfermedad provocada por el virus del papiloma humano (VPH).

Los linfocitos T CD8⁺ son una de las poblaciones celulares más importantes para llevar a cabo una respuesta citotóxica contra las células tumorales, por lo que su estimulación y activación es crucial para lograr un efecto antitumoral. Este tipo de linfocito interactúa con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I), las cuales presentan pequeños péptidos en la superficie de las células nucleadas. Dichos péptidos pueden ser antígenos virales o antígenos tumorales, los cuales son montados en las moléculas del MHC I en la luz de retículo endoplásmico (RE). Estudios previos en el laboratorio han demostrado que el envío de antígenos del virus del papiloma humano 16 (VPH-16) al RE induce una potente respuesta antitumoral.

En la actualidad se conoce que el RE además de cumplir con la síntesis de proteínas destinadas a diferentes organelos, a proteínas transmembranales y a las proteínas de secreción, juega un papel muy importante en la comunicación con el sistema inmune informando sobre el bienestar celular, pues al ocurrir una desestabilización en la síntesis de estas proteínas por factores externos (como las infecciones virales, insultos en los nutrientes o cambios drásticos de temperatura), se activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés). Esta respuesta tiene como objetivo aliviar el estrés de este organelo ocasionado por la acumulación de proteínas mal plegadas, a través de la sobreexpresión de chaperonas, como la proteína regulada por glucosa de 78 kDa/ proteína de unión a inmunoglobulina (GRP78/BiP por sus siglas en inglés), que se encargan de corregir el

plegamiento incorrecto de las proteínas. Si esto no es suficiente, la célula opta por enviar las proteínas a los sistemas de degradación, como la autofagia para las proteínas de vida media larga, y la degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD, por sus siglas en inglés) orquestada por el proteosoma 26S para las proteínas de vida media corta. Se ha descrito que algunos de los productos de la degradación del proteosoma son capaces de regresar al RE para montarse al complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I), los cuales tienen como destino la cara externa de la membrana celular. Si el estrés sobrepasa los niveles de restauración, la célula lleva a cabo la apoptosis o muerte celular programada.

En este trabajo se busca aprovechar este sistema para aumentar la exposición de antígenos ante el sistema inmune a través del sistema ERAD, utilizando construcciones de ácido desoxirribonucleico (ADN) que dirigen la expresión de una proteína de fusión conformada por el antígeno E7 del VPH-16 unido a la proteína ciclooxygenasa 2 (COX-2) para estimular su degradación por la vía del ERAD, y evaluar su efecto antitumoral.

ANTECEDENTES

Cáncer cervicouterino

El CaCu es la cuarta causa de muerte a nivel mundial, tan solo por debajo del cáncer de mama, el cáncer de colon y el cáncer de pulmón (Globocan, 2012). El CaCu se ha visto relacionado al VPH-16 y 18 en más del 70% de los casos (Braaten and Laufer, 2008), y su origen se da principalmente en las células que pertenecen al cuello uterino. Las células del cuello uterino sufren cambios, los cuales eventualmente se convierten en cáncer (American Cancer Society, 2018). Se sabe que más del 99.7% de los casos de éste tipo de cáncer están asociados al virus del papiloma humano (VPH) (Barrón et al., 2004). Por lo que es de gran importancia conocer los mecanismos moleculares de acción y propagación de dicho virus.

Virus del Papiloma Humano 16

El VPH-16 es un grupo vírico que infecta una gran cantidad de organismos, desde aves hasta mamíferos, incluido el hombre (de Villiers et al., 2004), y es considerado como una de las causas más comunes de enfermedades de transmisión sexual tanto en hombres como en mujeres alrededor del mundo. Estos virus infectan de manera específica a las células de la capa basal del epitelio escamoso estratificado queratinizado o no queratinizado y se replican en el núcleo de manera dependiente de la diferenciación celular. Este virus causa principalmente lesiones tumorales benignas que se logran controlar después de cierto tiempo, no obstante, en algunas ocasiones estas lesiones progresan y se convierten en tumores

malignos (Burd, 2003; Zheng and Baker, 2006). El VPH-16 es un virus desnudo, es decir no contiene una envoltura lipídica, cuenta con una cápside icosaédrica que envuelve el ADN de estructura bicatenaria de 8 kilobases (Kb) de longitud (de Villiers et al., 2004). De las distintas proteínas que expresa este virus, centraremos nuestra atención en E7, ya que se expresa en las células cancerosas por lo que se considera un antígeno específico de tumor (TSA) (Chen et al., 2000).

Proteína E7

El gen E7, de aproximadamente 300 a 320 pares de bases (pb), codifica para una proteína de aproximadamente 100 aminoácidos (aa) con un peso molecular de 10 kilodaltons (kDa) (Boyer et al., 1996) la cual posee un sitio con motivos de dedos de zinc en su extremo carboxilo terminal, que utiliza para su dimerización. La proteína E7 es fosforilada por la caseína II en el dominio N-terminal, uniéndose a la proteína del retinoblastoma (pRb), alterando su función (Hausen, 2000). E7 está conformada por tres dominios llamados CD1, CD2 y CD3, basados en la homología con la proteína E1A del adenovirus (Figura 1) (Boyer et al., 1996).

En este trabajo se utilizó la proteína E7, debido a que es considerada como una proteína poco inmunogénica, además de ser catalogada como antígeno específico de tumor (Chang et al., 2000). Esta proteína fue modificada deletando del aa 24 al 26 para evitar la unión al factor de transcripción pRB que propicia el efecto proliferativo que tiene de manera nativa (Roman and Munger, 2013). Además, se realizó la sustitución de dos residuos de cisteínas, por glicinas, localizadas en los aa número 58 y 91, provocando la pérdida del motivo estructural

de unión a zinc, ubicado en la región CR; se ha reportado que estos cambios aumentan la disponibilidad de antígenos ante el MHC I, mejorando la capacidad inmunoestimuladora mediada por linfocitos T citotóxicos contra células tumorales que expresan antígenos de E7 (Shi et al., 1999). A esta versión modificada le llamamos E7 doble mutante o E7dm.

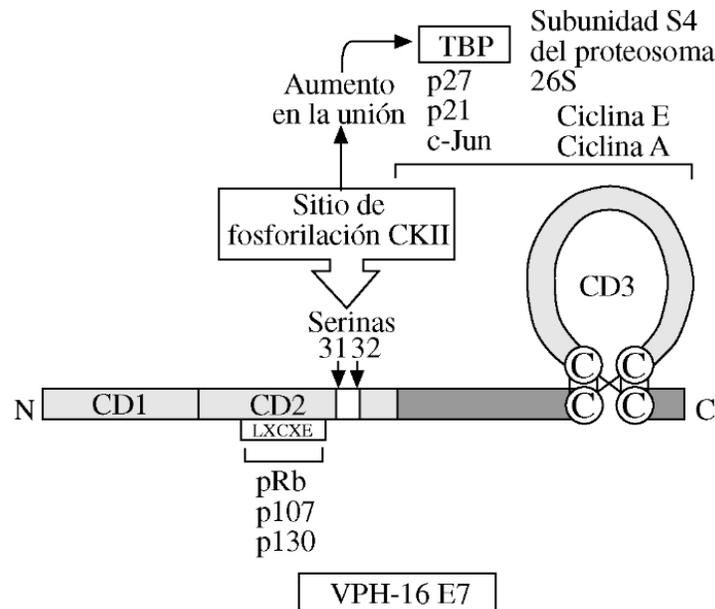


Figura 1. Esquema de la proteína E7 del VPH-16. Se muestran los dominios (CD1-CD3) altamente conservados y sus sitios de interacción con sus blancos proteicos (de la Cruz et al., 2004).

Respuesta Inmune celular y humoral en la infección por VPH

En la infección de mucosas las células de Langerhan's (CL) deberían activarse, madurar y migrar a los órganos linfoides una vez que se produce el reconocimiento por los receptores de patrones moleculares (Callejas, 2011). La propia configuración del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés) en el tracto urogenital se diferencia de otros en la falta de estructuras organizadas de linfocitos. Al mismo tiempo, la cápside del VPH inhibe la migración y maduración de las células LC (Rincón et al., 2007). Por lo que,

de manera natural, en este tejido no se pueden llevar a cabo respuestas inmunes contra antígenos ante la infección de este virus.

Dentro de la respuesta inmune celular los principales componentes son los linfocitos T citotóxicos (CTL), también conocidos como CD8+ (Chaplin, 2010; Joshi and Kaech, 2008), y células T cooperadoras de tipo 1 (Th1), también conocidos como CD4+. Las células Th1 activadas producen citocinas incluyendo interferón gamma (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) (Chaplin, 2010). El IFN- γ actúa directamente en la eliminación del virus por la inducción de un estado antiviral en las células, mientras que la IL-2 actúa indirectamente asistiendo la activación de CTL precursores a una población efectora. Ambas IFN- γ e IL-2 activan las células Natural killer (NK), las cuales son importantes en los primeros días de la infección hasta el desarrollo de una respuesta específica por parte de los CTL (Sallusto and Lanzavecchia, 2009). En la mayoría de las infecciones virales la respuesta de los CTL se desarrolla en 3 a 4 días. Como los CTL destruyen las células infectadas ellos también eliminan las fuentes potenciales para evitar una nueva infección.

Terapia génica

La terapia génica es la técnica por la cual se entrega material genético al organismo de interés a través de diferentes vectores, como lo pueden ser liposomas, vectores adenovirales o a través del método de la biobalística (Dachs et al., 1997). Éste último es uno de los métodos actualmente utilizados en nuestro laboratorio debido a su practicidad en la preparación del material genético y la entrega de este mismo. En la biobalística se entrega el ADN mediante presión inducida por gas helio, donde las partículas de oro utilizadas, recubiertas con el ADN

de interés, salen a gran velocidad para penetrar el tejido epidérmico y alojarse dentro de él en las células de la piel (Figura 2) (Yen and Lai, 2013).

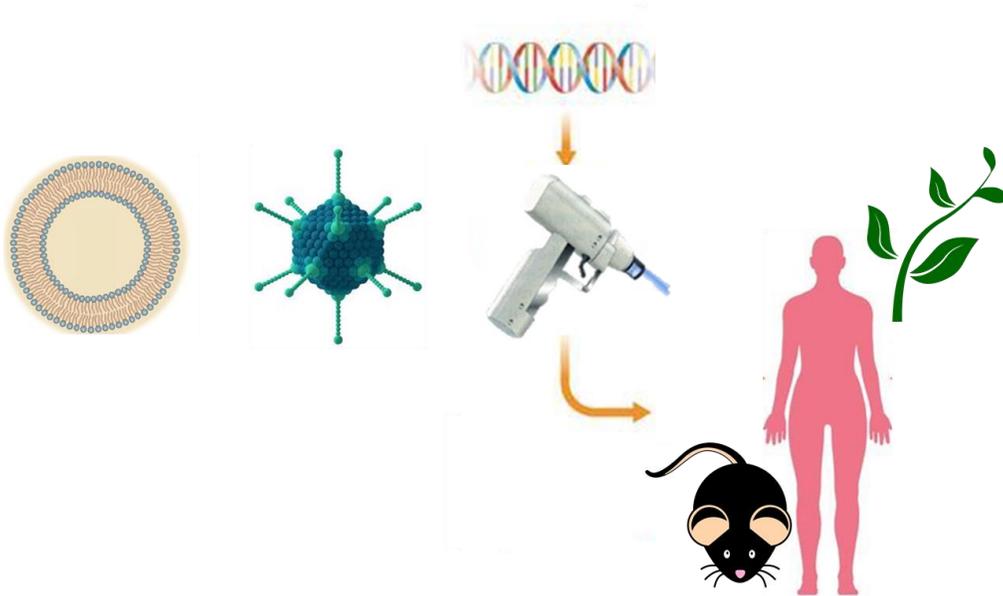


Figura 2. Terapia génica. La terapia génica es uno de los métodos para estimular una respuesta contra alguna anomalía en un organismo. Modificado de (Peter Bull Art Studio).

Una vez entregadas las partículas de oro con el ADN, entra en función la maquinaria celular para transcribir la proteína a partir de la molécula de ADN y dependiendo de la naturaleza de la construcción, la proteína interactúa en diferentes vías para lograr el objetivo de dicha terapia génica.

Kim y colaboradores mostraron la importancia de generar una fusión entre un antígeno y una proteína que dirija la expresión de ésta a vías de estimulación del sistema inmune, para ello utilizaron un modelo murino antitumoral del VPH-16 utilizando la biobalística y la fusión del oncogen E7 fusionado a diferentes proteínas (Kim et al., 2004).

La fusión de la proteína E7 del VPH-16 con la chaperona calreticulina mostró un gran efecto antitumoral en los modelos murinos de Kim y colaboradores. Esto dio paso a una serie de investigaciones en modelos antitumorales utilizando estas proteínas de fusión aplicadas con diferentes vectores para observar la importancia de cada uno de los segmentos en la respuesta inmune (Cheng et al., 2001, 2005; Gómez et al., 2007; Rangel-Colmenero et al., 2014).

Chaperonas

Las chaperonas son un conjunto de proteínas que tienen como función censar y corregir la desestabilización de las proteínas mal plegadas recién sintetizadas. Estas moléculas se asocian a la cadena de polipéptidos en crecimiento y a los factores intermediarios recientemente plegados de las proteínas nacientes, evitando el mal plegamiento y su agregación (Figura 3) (Fink, 1999). Muchas de las chaperonas son proteínas conocidas como de choque térmico, aunque el calor no es el único factor de estrés conocido, otros factores son el alcohol, la isquemia-hipoxia, los metales pesados y la hipersalinidad. Es por ello que las proteínas de estrés y las chaperonas moleculares en conjunto, se les conoce como proteínas de choque térmico (Hsp, por sus siglas en inglés) (Macario and Conway de Macario, 2007).

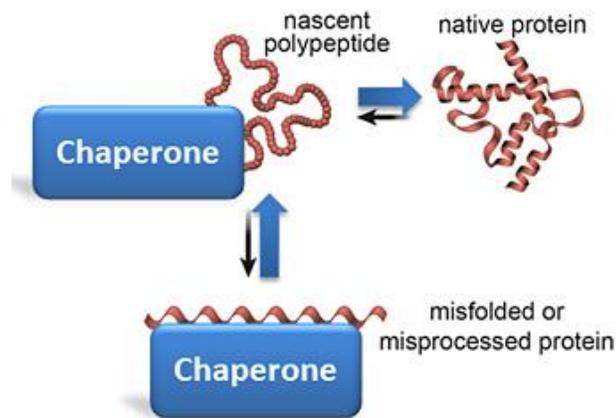


Figura 3. Función de las chaperonas. Las chaperonas se encargan de ayudar al correcto plegamiento de las proteínas recién sintetizadas a partir de sus cadenas de polipéptidos (Sanders, 2014).

Calreticulina

La calreticulina es una proteína residente del RE la cual se considera una molécula pleiotrópica con múltiples funciones en el RE, que van desde el plegado de las proteínas, la homeostasis de calcio, la regulación del cargado de los péptidos antigénicos en las moléculas de MHC I, regulador transcripcional, proliferación, adhesión, migración y apoptosis celular (Figura 4) (Yokoyama and Hirata, 2005). Bajo ciertas condiciones la calreticulina puede ser encontrada como una proteína de membrana o extracelular, donde desempeña un papel importante en el proceso llamado “muerte inmunogénica” (Chaput et al., 2007). Por otro lado, recientemente se ha asociado la sobreexpresión de calreticulina a diferentes tipos de cáncer, como de páncreas, mama, próstata y estómago, entre otros (Sheng et al., 2014).

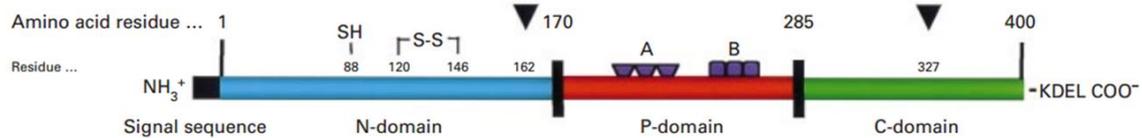


Figura 4. Estructura de la calreticulina. La calreticulina está compuesta por los dominios N,P y C, éstos flanqueados por dos señales a RE, el péptido señal en su extremo amino terminal y la señal de retención en RE en el extremo carboxilo terminal, denominada KDEL por los aa que la componen (Yokoyama and Hirata, 2005).

En nuestro laboratorio ya hemos obtenido resultados muy prometedores mediante la adición únicamente del péptido señal de calreticulina y una señal de retención de antígenos al RE, tanto con vacunas adenovirales, como vacunas de ADN (Loera-Arias et al., 2010; Perez-Trujillo et al., 2017). El uso de este sistema provee la ventaja de disminuir la sobreexpresión de proteínas exógenas que pudieran afectar la homeostasis celular, como es el caso de la calreticulina, por lo cual podría ser una opción más segura.

Estrategias para estimular una respuesta inmune antitumoral

En la respuesta inmune antitumoral los linfocitos T citotóxicos juegan un papel muy importante. Para que un linfocito T reconozca un antígeno a través de los receptores de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) hace falta que ese antígeno sea digerido intracelularmente hasta convertirlo en péptidos, y que éstos sean expuestos en el surco de moléculas MHC del propio haplotipo. Para que estos péptidos sean montados a las moléculas de MHC I primero deben de entrar en el RE, para posteriormente, con ayuda de proteínas chaperonas, éste sea montado en las moléculas de MHC I y, por último, expresados en la superficie celular.

Se ha reportado que por cada 10^4 proteínas citoplasmáticas que son degradadas por el proteosoma solo 1 péptido es ensamblado en el MHC de clase I (Yewdell, 2001). En años recientes, se han desarrollado varias estrategias que superan esta limitación y potencian la respuesta inmune. Una de estas estrategias se basa en el envío de antígenos directamente al RE, esto mediante la fusión a una proteína residente del RE, como por ejemplo, calreticulina (Cheng et al., 2001). Al inmunizar ratones con esta fusión se logró potenciar de manera significativa la respuesta inmune antitumoral, además se demostró que la respuesta inmune montada es específica contra el antígeno E7 y que es mediada por linfocitos T citotóxicos; sin embargo, se menciona que el mecanismo es poco conocido. Desde entonces, se han realizado múltiples reportes que involucran a esta misma construcción o variantes de esta misma. Además, en los últimos años se ha asociado a calreticulina con la inducción de una muerte inmunogénica, lo cual podría estar potenciando su efectividad terapéutica (de Bruyn et al., 2015).

El retículo endoplásmico

Como es bien sabido el RE cumple con funciones de síntesis de proteínas. El lumen posee un ambiente oxidante el cual es crítico para la formación puentes disulfuro y el correcto plegamiento de las proteínas. Además, posee la concentración de calcio más alta dentro de la célula. Debido a su rol en el plegamiento y transporte de proteínas, el RE es rico en chaperonas dependientes de Ca^{2+} , como GRP78/BiP, GRP94, y calreticulina, la cual estabiliza los intermediarios en el proceso de plegamiento de las proteínas. Para llevar a cabo sus funciones el RE posee diversos mecanismos para la verificación de la calidad de las

proteínas procesadas. Uno de ellos es la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (del inglés Unfolded Protein Response) (Xu et al., 2005).

Existen diferentes factores que pueden influir en el desequilibrio del RE, como lo son los insultos de nutrientes, infecciones virales, un exceso de la demanda proteica, toxinas ambientales y la expresión de proteínas mutantes resultante de la acumulación de proteínas mal plegadas (Osowski and Urano, 2011). La UPR, tiene como objetivo reestablecer la homeostasis del RE, siendo una vía muy conservada desde levaduras hasta mamíferos superiores (Brostrom and Brostrom, 1998; Hetz, 2012). Para lograr esto se activan vías de señalización que permiten activar la producción de chaperonas moleculares involucradas en el plegamiento de las proteínas; posteriormente, se detiene la traducción del resto de las proteínas celulares. Si la célula no logra restablecer el equilibrio y la anomalía persiste se activan las vías de muerte celular (Xu et al., 2005).

Se considera que generalmente la respuesta UPR involucra 3 vías de señalización que emergen del RE. Entre estos sensores de estrés se encuentran: la enzima que requiere de inositol-1 (IRE-1, por sus siglas en inglés), la proteína quinasa de retículo endoplásmico (PERK, por sus siglas en inglés) y el factor activador de transcripción 6 (ATF6, por sus siglas en inglés), siendo las tres proteínas integrales de la membrana del RE. La activación de estos sensores depende de la disociación de la proteína chaperona GRP78/BiP. A medida que las proteínas mal plegadas se acumulan en el RE, GRP78/BiP es secuestrada permitiendo su dimerización y activación. IRE1 y PERK son activadas por homodimerización y fosforilación, mientras que ATF6 es transportada al aparato de Golgi donde sufre proteólisis

para liberar su dominio citoplasmático, el cual se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes (Figura 5) (Tsai and Weissman, 2010).

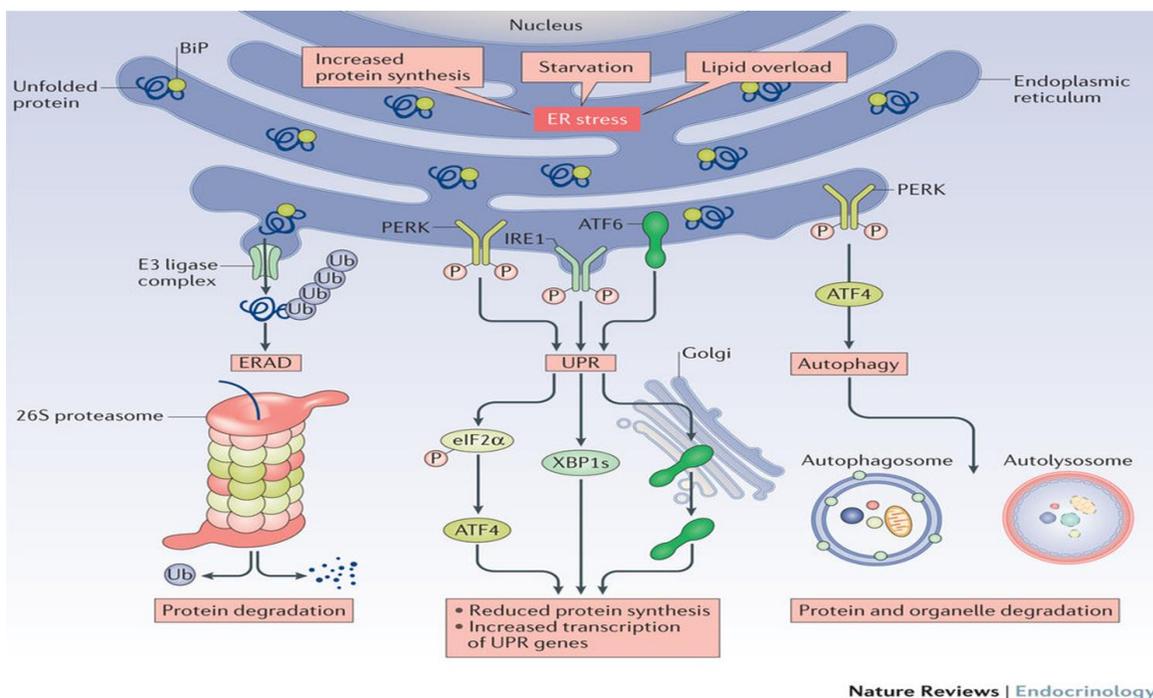


Figura 5. Respuesta a proteínas mal plegadas. La UPR es orquestada por los sensores de estrés ATF6, PERK e IRE-1, tres proteínas que se encuentran de manera transmembranal en el RE, que río abajo inducen la regulación de la homeostasis en este organelo (Baiceanu et al., 2016).

El RE ayuda además a informar al sistema inmune sobre el estatus celular, a través del MHC I, donde aproximadamente el 0.1% de los péptidos que resultan de la degradación por el proteosoma 26S, se montan en el MHCI para ser transportados de manera transmembranal a la cara externa de la membrana celular (Figura 6) (Neefjes and Ovaa, 2013). Ahí linfocitos T reconocen lo extraño de lo propio, despertando una respuesta inmune celular en caso de detectar antígenos extraños (Pennock et al., 2013).

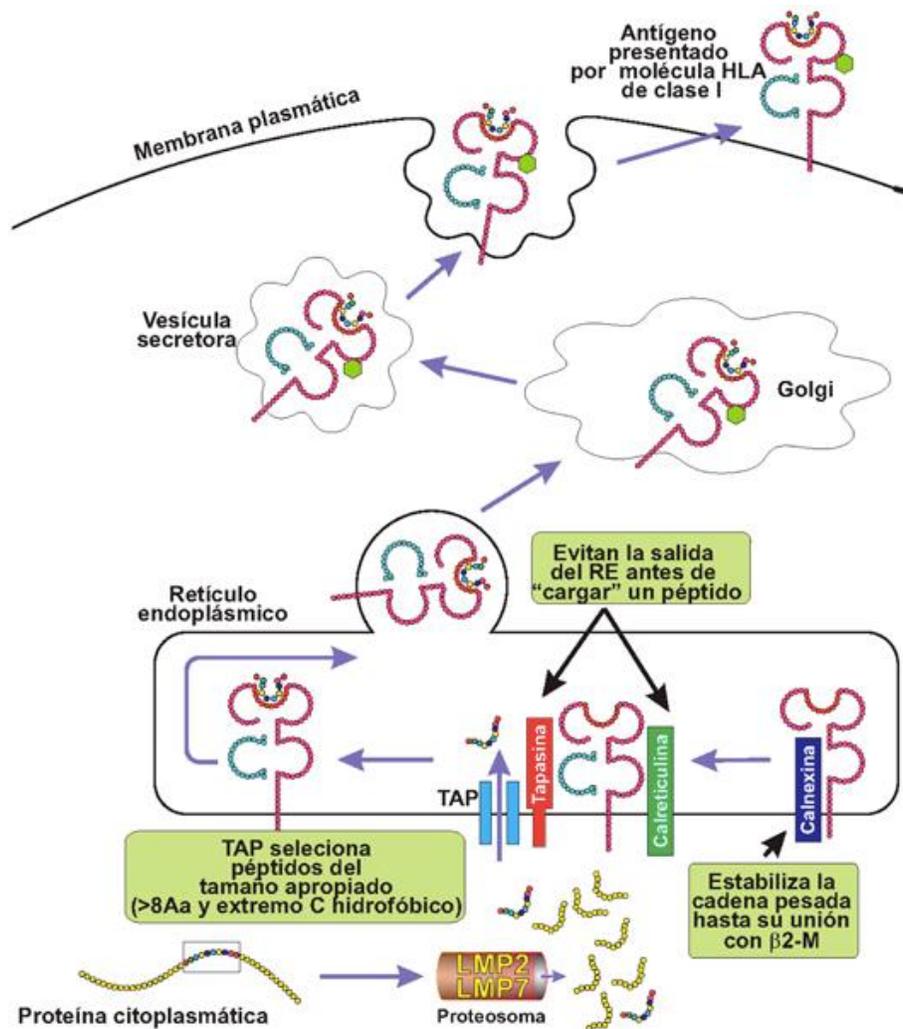


Figura 6. Presentación de antígenos. Antígenos propios, virales o tumorales son procesados por el proteosoma para degradarlos en pequeños péptidos que luego ingresan al RE para ser ensamblados, con la ayuda de chaperonas, en moléculas de MHC I. Estas migran a la superficie celular donde realizan la presentación de antígenos a células como los linfocitos T.

Sistema de degradación asociado al retículo endoplásmico

La célula tiene un proceso de control de calidad para detectar proteínas defectuosas en el procesamiento que se lleva a cabo en el RE, como son la N-glicosilación y la formación de puentes disulfuro. En éste participan proteínas como calreticulina y calnexina, las cuales

actúan como chaperonas tratando de rescatar a estas proteínas. Las proteínas mal plegadas que fallan en su rescate exponen residuos hidrófobos que participan en la unión a la proteína chaperona GRP78/BiP, lo cual previene que estas proteínas continúen su tránsito y secreción (Araki and Nagata, 2011).

Las proteínas que continúan mal plegadas deben de ser degradadas, ya que de otra forma causarían su acumulación y agregación, por lo que entran en el proceso de degradación asociada a retículo endoplásmico o ERAD. Este proceso comienza con la retrotranslocación de estas proteínas al citosol en asociación con complejos transitorios con EDEM, PDI y GRP78/BiP. Posteriormente se involucra la vía del ubiquitin-proteosoma, lo que conlleva a la degradación por proteosomas citoplasmáticos (Figura 7) (Yewdell, 2001). En nuestro grupo de trabajo observamos que hay una relación entre las construcciones de ADN que dirigen su expresión al RE con la activación de la respuesta a estrés UPR y la vía del ERAD (Martínez Puente, 2016), las cuales mostraron un mejor efecto antitumoral en los modelos murinos (Loera-Arias et al., 2010; Perez-Trujillo et al., 2017).

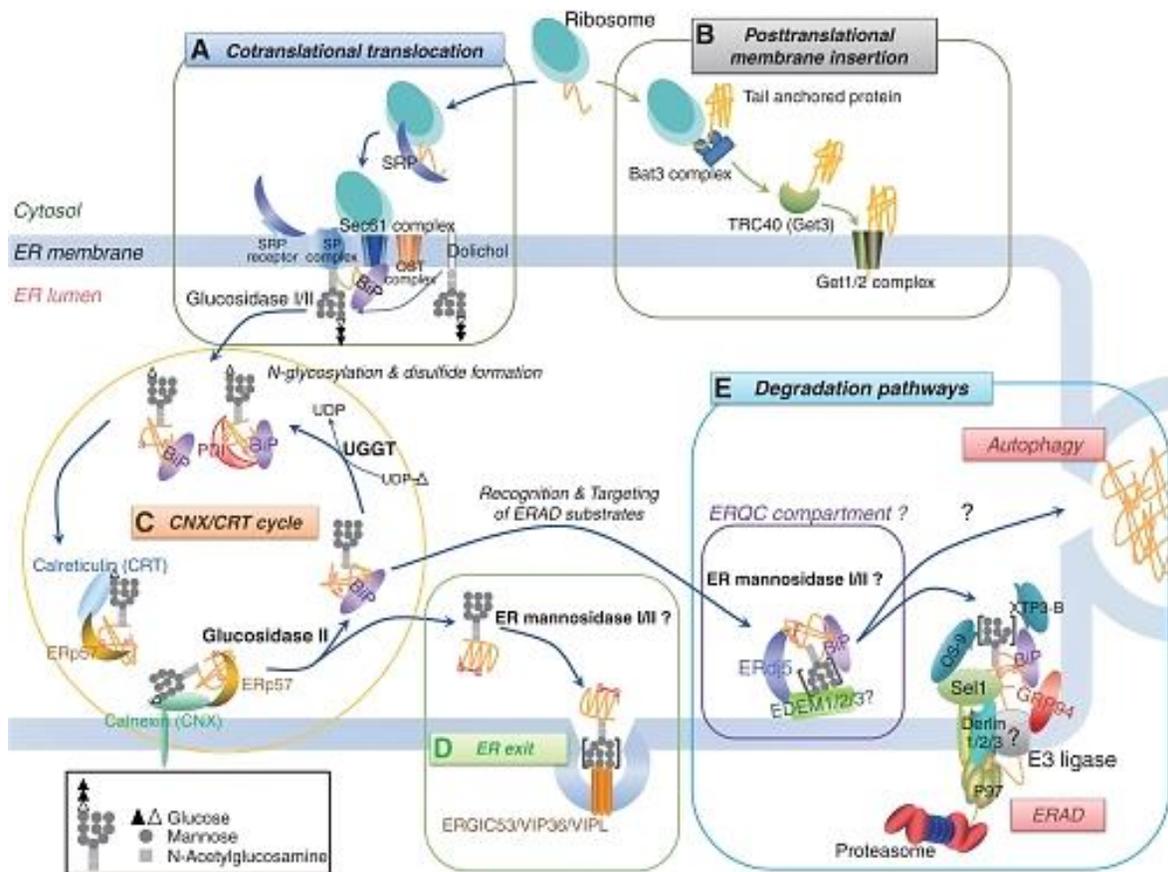


Figura 7. Mecanismos de la regulación de proteínas en el RE. Las chaperonas son las encargadas de realizar el plegamiento correcto de las proteínas sintetizadas en el RE, si estas son correctamente plegadas sufren modificaciones postraduccionales para dirigirse a sus diferentes destinos. Si las proteínas son mal plegadas, se activan mecanismos de degradación por diferentes tipos de vías, según las características de las proteínas.

Para la selección y la iniciación de la entrada del sustrato al sistema ERAD es esencial la presencia de residuos que estén unidos a grupos de oligosacáridos. Se han identificado varias proteínas transmembranales nativas del RE que sirven como sustrato para el ERAD (Figura 8). Estas proteínas incluyen al citocromo P450 CYP3A4, la reductasa de HMG-CoA y la COX-2, entre otras (Brodsky, 2012).

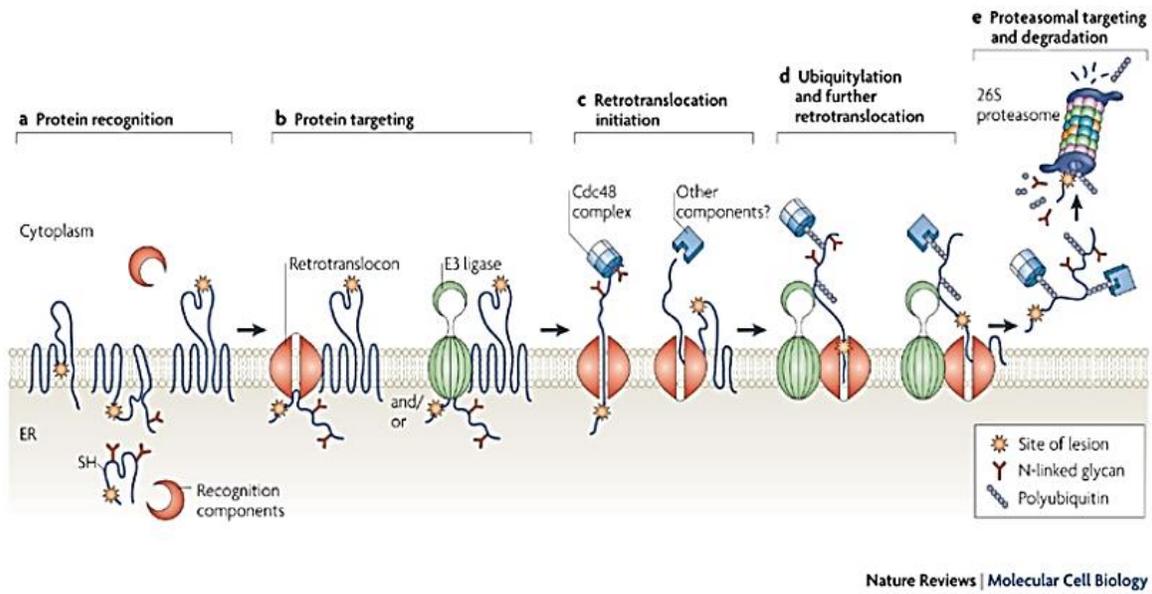


Figura 8. Degradación asociada a retículo endoplásmico. La respuesta, también llamada ERAD, ocurre con una serie de pasos que comienza con el reconocimiento de las proteínas, su direccionamiento y retrotranslocación al citosol, el marcaje con ubiquitinas y por último la degradación por el proteosoma (Vembar and Brodsky, 2008).

Ciclooxigenasa

Las ciclooxigenasas 1 y 2 están involucradas en la biosíntesis de prostaglandinas. Ambas son muy similares en cuanto a su estructura primaria, sin embargo, tienen distintos patrones de expresión. Se ha encontrado que la COX-2 posee una vida media de 2 horas (h), la cual se puede retrasar utilizando inhibidores del proteosoma, mientras que la COX-1 posee una vida media de 12 h (Simmons et al., 2004). Estudios posteriores han identificado en la proteína COX-2 un cassette de 19 aa (NASASHRLDDINPTVLIK) en el extremo carboxilo con un sitio de glicosilación en su extremo amino la cual es vital para dirigir a la proteína al sistema ERAD para su degradación proteosomal (Mbonye et al., 2006). La ciclooxigenasa 2 es también conocida como prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 o PTGS2. Esta enzima

cataliza dicho paso en la biosíntesis de prostaglandinas. La expresión de COX-2 es inducida durante la inflamación (Figura 9) (Mejjide et al.). En este trabajo se evaluó la importancia de la fusión de COX-2 con E7 y la ausencia de su casete de degradación de 19 aa, en el efecto antitumoral en modelos murinos.

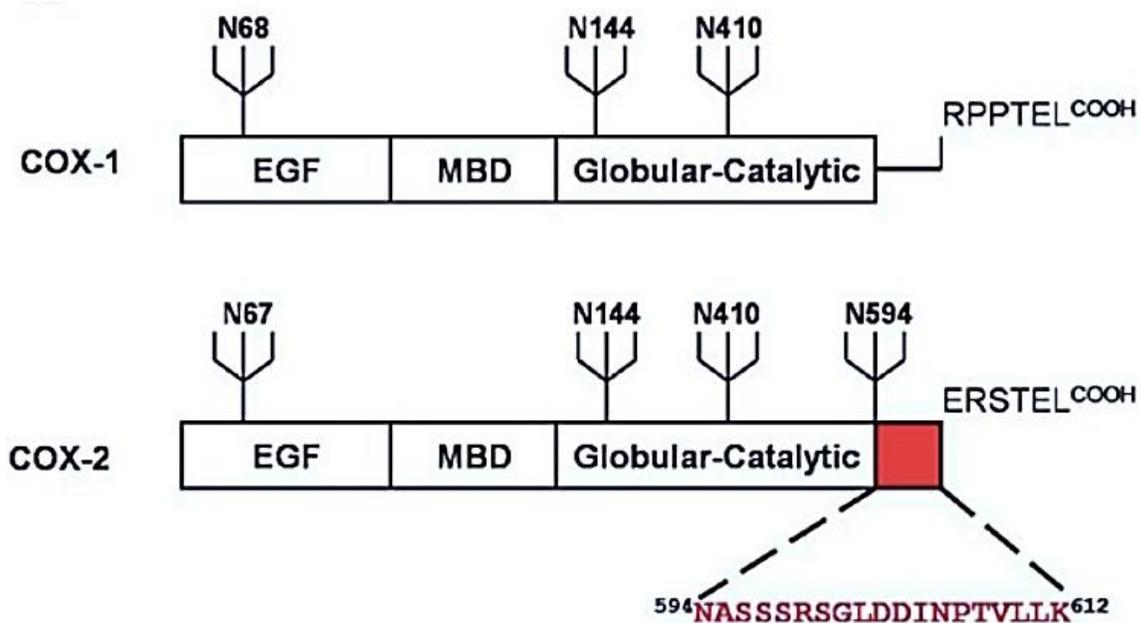


Figura 9. Estructura de las proteínas COX-1 y COX-2. EGF: dominio denominado factor de crecimiento epidérmico, MBD: Dominio de unión a membrana, dominio globular catalítico. En color rojo se puede observar el sitio de glicosilación N594 y la secuencia de 19 aa para la degradación de la proteína COX-2.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de cérvix es una de las principales causas de muerte en mujeres a nivel mundial, una de las estrategias para combatirlo es el de hacer uso de antígenos específicos del tumor. De estos, E7 es un buen blanco para generar respuestas inmunes contra el cáncer cervicouterino; sin embargo, es poco inmunógeno por lo que no se generan respuestas utilizando el antígeno sólo. Por ello, este antígeno se ha fusionado a diferentes proteínas, para incrementar su inmunogenicidad mediante su envío al RE. Una vez que los antígenos son enviados al RE, se puede inducir una respuesta de estrés en este organelo, enviando los antígenos a degradar mediante el sistema ERAD, con lo cual se pudiera mejorar la presentación de estos antígenos. Por lo anterior, en este proyecto se evaluará si el efecto antitumoral del antígeno E7 del VPH-16 se potencia al incrementar su degradación por la vía del sistema ERAD mediante su fusión a la proteína COX-2, debido a su casete de degradación de 19 aminoácidos.

HIPÓTESIS

El antígeno E7 del VPH-16 fusionado a COX-2 posee un mejor efecto antitumoral que fusionado a calreticulina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la proteína COX-2 fusionada a E7 le confiere un mayor efecto antitumoral que la fusión a calreticulina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar y construir un vector para la expresión de la fusión del antígeno E7 a COX-2.
2. Demostrar la expresión de la proteína E7 fusionada a COX-2.
3. Analizar la vida media del antígeno E7 fusionado a COX-2.
4. Determinar si la fusión de la proteína COX-2 al antígeno E7 le confiere un efecto antitumoral.

MATERIAL Y EQUIPO

Línea celular

- HEK-293 (QBI-293A, ATCC), células embrionarias de riñón humano, contienen el gen adenoviral E1 integrado en su genoma.
- TC1 (CRL-2785, ATCC), células endoteliales de pulmón de ratones de la cepa C57BL/6, transformadas con los genes E6 y E7 del VPH-16 y el oncogen *ras*.

Bacterias

- *Escherichia coli* de la cepa DH5 α , bacterias utilizadas para la clonación de los plásmidos de interés.

Enzimas

- Bgl II (Cat. No. R0144S, New England BioLabs)
- Kpn I (Cat. No. R0599S, New England BioLabs)

Plásmidos

Tabla 1. Plásmidos utilizados para la expresión de las proteínas de interés.

Nomenclatura	Significado
CRT-E7	Calreticulina+E7 wild type
COX2-E7	COX-2+E7dm
COX2	COX-2
COX2-E7ΔERAD	COX-2+E7dm y delección del casete de 19 aminoácidos (ERAD)
E7wt	E7 wild type
pUMC4a	Plásmido vacío

Anticuerpos

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para el análisis de las proteínas de interés.

Anticuerpo	COMPAÑÍA	#Catálogo	Dilución
Anti E7 Monoclonal De Ratón IgG.	Santa Cruz Biotechnology, Inc	SC-65711	Western Blot: 1:3000 Inmunofluorescencia: 1:200
Anti Cox-2 Monoclonal De Ratón IgG.	Santa Cruz Biotechnology, Inc	SC-166475	Western Blot: 1:3000
Anti Grp78 Policlonal De Conejo IgG.	Santa Cruz Biotechnology, Inc	SC-13968	Western Blot: 1:500 Inmunofluorescencia: 1:100
Anti B-Actina Monoclonal De Ratón IgG.	R&D Systems. Usa	MAB8929	Western Blot: 1:5000
Anti-Ratón IgG Hrp.	Bio-Rad Laboratories. Inc	170-6516	Western Blot: 1:5000 para COX-2 y E7
Anti-Conejo Hrp IgG.	Santa Cruz Biotechnology, Inc	SC-2004	Western Blot: 1:2000 para GRP78
Anti-Ratón Alexa Flour 594 IgG (H+L).	Thermo Fisher Scientific Inc	A11032	Inmunofluorescencia: 1:200
Anti-Conejo Alexa Fluor 488 IgG (H+L).	Thermo Fisher Scientific Inc	A11008	Inmunofluorescencia: 1:200

Cultivo bacteriano

- Medio LB Broth Miller (USBio)
- Glicerol (Sigma-Aldrich)
- Kanamicina
- H₂O ultrapure

Cultivo celular

- Medio Eagle Modificado de Dubelcco (DMEM)
- Medio RPMI 1640
- Tripsina EDTA 0.25%
- PBS 1X pH 7.4 (Gibco)
- Suero fetal bovino (ATCC)
- Dimetil sullfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Azul tripán
- Cámara de Neubauer .100mm de profundidad (Marienfeld Germany)
- H₂O ultrapure

Reactivos

- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA)
- Plasmid Midi Kit (100) (QIAGEN® Venlo, Limburgo, Países Bajos)
- TurboFect™ *in vitro* Transfection Reagent (Fermentas Inc., USA)

- Midi-Prep Kit (Quiagen, Inc)
- GelRed Nucleic Acid 10,000X (Biotium)
- DAPI 0.1 mg/ mL
- Metanol 100% (Sigma-Aldrich)
- Acetona (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich)
- Coctel de inhibidor de proteasas y fosfatasas (Halt Thermo Fisher Scientific)
- Acrilamida-bisacrilamida 30% (Bio-Rad)
- Cicloheximida (C7698, Sigma-Aldrich)

Soluciones

- Buffer de lisis celular RIPA 1X (EDTA 5mM, Coctel de inhibidor de proteasas y fosfatasas 1X, PMSF .2mM)
- Buffer CutSmart® 10X (New England BioLabs)
- Buffer Tris-Glicina-SDS 1X (Tris Base 25mM, Glicina 250mM, SDS 0.1%)
- Buffer de empaquetamiento para proteínas 4X (0.5M Tris-HCl pH 6.8)
- Buffer de carga para ADN 6X (New England BioLabs)
- Buffer TBST (Tris-HCl 20mM, NaCl 137mM pH 7.6, Tween 20 0.05%)
- Persulfato de amonio (PSA) al 10% (Sigma-Aldrich)
- PBS 1X pH 7.4 (Gibco)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1.74% (Sigma-Aldrich)

- Dithiothreitol (DTT) 15% (Sigma-Aldrich)
- Leche descremada al 10% en buffer TBST
- Dodecilsulfato sódico (SDS) 10% (USB CO.)
- Tris-HCL 1.5M pH 8.8
- Tris-HCL 0.5M pH 6.8

Material

- Pipetas serológicas de 10 ml y 5 ml (Cornig)
- Pipetor
- Cajas de cultivo celular 75 cm² y 25 cm² (Cornig)
- Criotubos de 2 ml (Cornig)
- Viales de 2 ml, 1.7 ml y .65 ml
- Laminillas de 8 celdas (Lab-Tek II)
- Placas de 6 pozos (Cornig)
- Cajas Petri de 78 cm² y 28 cm² (Cornig)
- Tubos tipo Falcón de 50 ml y 15 ml (Cornig)
- Matraces de 1 litro
- Membranas de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) (Bio-Rad)
- Cajas incubadoras de membrana

Equipo

- Micropipetas de 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l y 2 μ l
- Campana de seguridad nivel II
- Microscopio invertido para observación de placas y cajas de cultivo
- Estación de poder para electroforesis y transferencia (Labnet)
- Espectrofotómetro (Biophotometer, Eppendorf)
- Bascula Analítica (AND)
- Vortex (Daigger)
- Incubadora con CO₂ (Thermo)
- Cámara para geles de Poliacrilamida. (Bio-Rad)
- Cámara de transferencia semihumeda. (Bio-Rad)
- Incubadora Orbital SHAKER (Mrc) 37°C y 4°C
- Lector de placas de ELISA (Bio-Rad, i Mark Microplate Reader)
- Centrifuga (Sigma 1-15K) y microcentrifugas refrigeradas (Sigma 3-15K)
- Ultra refrigerador (-80°C) (Thermo)
- Congelador (-20°C)
- Tanque con Nitrógeno líquido
- Escáner de quimioluminiscencia para Western Blot (LI-COR)
- Transiluminador (Bio-Rad)
- Microscopio de Fluorescencia (Leica)
- Cámara Infinity para microscopio de campo claro y fluorescencia

METODOLOGÍA

Consideraciones éticas y de bioseguridad

Como medidas de bioseguridad especiales para el uso de cepas recombinantes se llevaron a cabo las recomendaciones del NIH para organismos de tipo BSL1. En resumen: la descontaminación diaria de la campana de flujo laminar de la campana de flujo laminar donde se trabajó con estas muestras, se utilizó bata y guantes para manipulación de los mismos, lavado de manos antes y después de trabajar con estos organismos. Así mismo, todos los materiales plásticos y desechos líquidos que estuvieron en contacto con ellos fueron descontaminantes con cloro al 4% y pasados por la autoclave antes de ser desechados. Todas las jeringas utilizadas para la manipulación de los mismos fueron desechadas en contenedores plásticos especiales para punzocortantes de color rojo.

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

Los cultivos de las cepas bacterianas fueron desechados en bolsas rojas etiquetadas y los tubos no desechables fueron esterilizados en la autoclave y tratados con cloro al 4% antes de ser lavados.

Los cadáveres y desechos de los ratones fueron depositados en bolsas amarillas etiquetadas antes de ser enviados al área de almacenen temporal del Hospital Universitario, donde se llevó a cabo su deposición final.

El uso y manejo de los ratones se hizo siguiendo las disposiciones de la NOM-062-ZOO-1999.

Bacterias

Echerichia coli DH5 α : Las bacterias calcio competentes se transformaron de manera independiente con cada uno de los plásmidos que contienen las construcciones de interés, aquellas bacterias que integraron el vector adquirieron resistencia a kanamicina, por lo que fueron seleccionadas con este antibiótico. Cultivos de 200 mililitros (ml) se utilizaron para realizar un midiprep con el QIAGEN Plasmid Midi Kit para extraer los plásmidos de interés siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Líneas celulares

La línea celular de riñón embrionario humanos (HEK-293, por sus siglas en inglés), fue mantenida en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino e incubadas a 37 grados Celcius ($^{\circ}$ C) y una concentración de dióxido de carbono (CO_2) al 5%. Para su almacenamiento fueron tratadas con 5% DMSO y guardadas a una temperatura de -80 $^{\circ}$ C; para almacenaje a largo plazo fueron colocadas en nitrógeno líquido.

La línea celular TC-1 procedente de pulmón de ratón de la cepa C57BL/6, fue mantenida en medio de cultivo RPMI suplementado al 5% con suero fetal bovino e incubadas a 37 $^{\circ}$ C y una concentración de CO_2 al 5%. Para su almacenamiento fueron tratadas con 5% DMSO y

guardadas a una temperatura de -80 °C; para almacenaje a largo plazo fueron colocadas en nitrógeno líquido.

Ratones

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6. Los ratones fueron adquiridos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma de Metropolitana, DIV.CBS. Xochimilco, al llegar fueron alojados en el Bioterio del Departamento de Histología. Los ratones estuvieron bajo ciclos de 12 h luz/oscuridad con agua y alimento *ad libitum*.

Para los ensayos se aplicó el uso de la anestesia, antes del implante tumoral y previo a las inmunizaciones, con ketamina y xilacina a dosis de 80-100 miligramos/kilogramos (mg/kg) y 10-12.5 mg/kg respectivamente. La administración de la anestesia fue por vía intraperitoneal. La verificación del plano anestésico fue mediante la observación de la disminución de la frecuencia respiratoria y la frecuencia cardiaca, además de la ausencia de respuesta del murino al tacto, a estímulos externos (ej, dolor) y al intentar despertarlos.

En los ensayos profilácticos y terapéuticos se midió el ancho y largo del tumor cada tercer día con ayuda de un vernier para graficar el volumen del tumor, el cual se calculó con la fórmula: $(\text{Diámetro menor})^2 (\text{Diámetro mayor})/2$. La fecha de sacrificio o muerte de los ratones fue graficada para comparar la sobrevida en los distintos tratamientos. Los sacrificios se realizaron acorde a los criterios de punto final (definidos adelante).

Se realizó una evaluación cada dos días del estado de salud del murino para observar la presencia de los criterios de punto final. El analgésico empleado fue meloxicam por vía oral una dosis de 5-10 mg/kg en un tiempo de 24-48 h en caso de ser requerido.

Criterios de Punto Final

1. Pérdida de peso de un 20 a un 25% o la presencia de caquexia.
2. Body Condition Score de menos de 2 (el murino está demacrado, la estructura esquelética está prominente, la segmentación de las vértebras es evidente).
3. Anorexia completa por más de 24 h.
4. Debilidad o dificultad para alimentarse o beber agua, dificultad para la movilización.
5. Estado moribundo, medido mediante una falta de respuesta a estímulos táctiles.
6. Infección que involucre cualquier órgano o sistema, evidenciando por secreción purulenta, eritema, edema, dolor, hipertermia.
7. Valoración del tumor, no más de 15 mm de largo, no mayor a un volumen de 1500 mm³ y que no sobrepase el 10% del peso del ratón.

La presencia de uno o dos de estos criterios fue suficiente para la aplicación del método de analgesia y 2 o más para el método de eutanasia que se mencionado en los siguientes puntos.

La presencia de un tamaño tumoral mayor a los 15 mm indica el método de eutanasia, sin importar el resto de los criterios.

Eutanasia

El método seleccionado es el de sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico). Se utilizó una dosis de 100 mg/kg por vía intraperitoneal. Utilizamos este método ya que es la primera elección para uso de murinos. Los métodos de verificación de muerte de los murinos que se emplearon fueron los siguientes;

- Asegurar que no exista el reflejo corneal (esto mediante el tacto del globo ocular)
- Frecuencia cardiaca
- Frecuencia respiratoria

En el caso que se presentara el latido del corazón o el reflejo corneal, se repitió la dosis de pentobarbital sódico y se comprobó la eutanasia por dislocación cervical.

El número de ratones utilizado fue de 5 ratones por grupo que es lo mínimo reportado en la mayoría de los ensayos antitumorales.

Diseño y construcción de los plásmidos

Para el diseño de la construcción se utilizó la secuencia de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de la proteína COX-2 murina en la base de datos del NCBI, junto con la secuencia de ADNc que codifica para la proteína E7 del VPH-16, además se buscó la secuencia que codifica para la señal de retención en RE de la calreticulina. Se utilizaron sitios de restricción específicos para flanquear cada una de las secuencias de interés. Para optimizar

traducción de la proteína de fusión de optó por utilizar el promotor de alta expresión de citomegalovirus (CMV) (Figura 10 y 11).

Los diseños de los plásmidos se realizaron en el programa SnapGene versión 1.1.3. Las construcciones fueron sintetizadas por la compañía GenScript, en el vector pUC57.

Los plásmidos adquiridos fueron digeridos con las enzimas *KpnI* (Cat. No. R0599S, New England BioLabs) y *BglIII* (Cat. No. R0144S, New England BioLabs), para posteriormente ser canalizados mediante electroforesis en un gel de electroforesis 1% agarosa en buffer TAE, una vez separados los fragmentos se purificaron y ligaron al vector pUMC4a. Este plásmido contiene una secuencia inmunoestimuladora por lo que ha sido ampliamente utilizado para este tipo de vacunas de ADN. Los plásmidos fueron transformados en la cepa de *E. Coli* DH5-alpha para su producción a gran escala. Debido a las funciones transformantes de E7 del HPV-16, se utilizó una versión mutante sin capacidad transformante, pero que conserva las secuencias de los péptidos inmunogénicos.

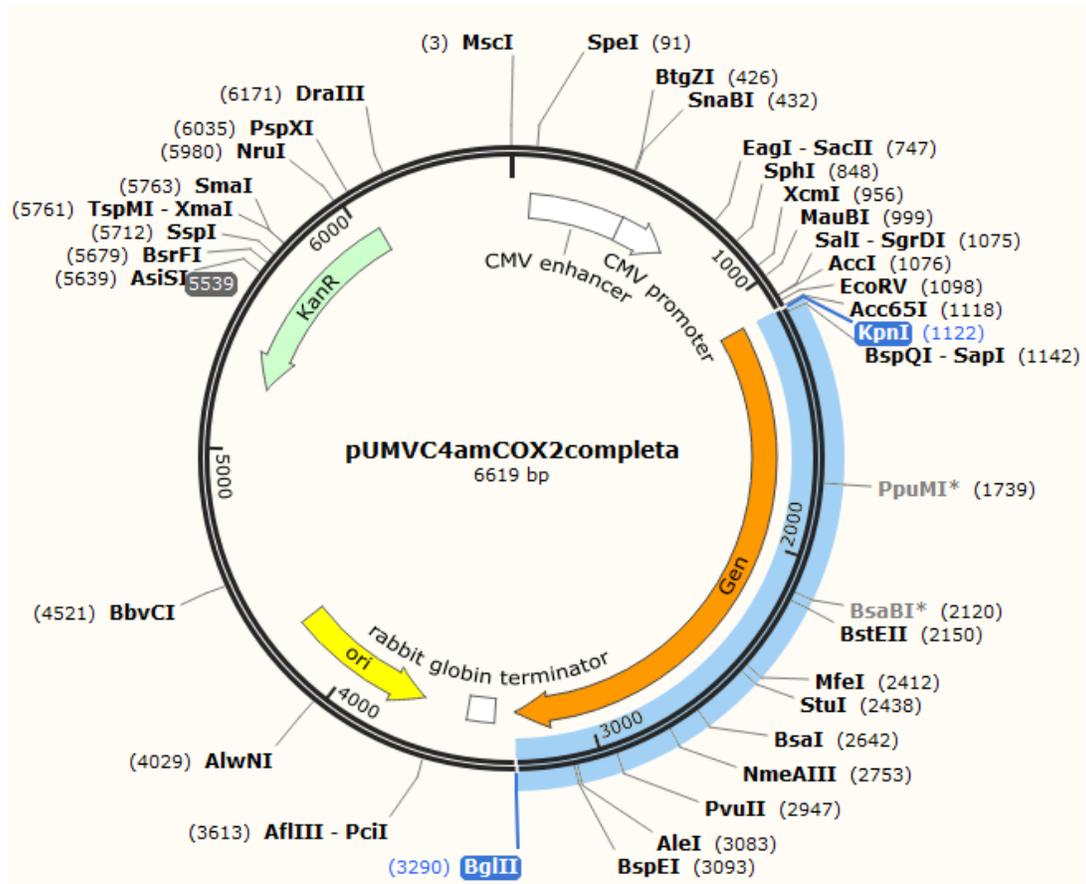


Figura 10. Diseño y estructura de la construcción con las proteínas COX-2 murina, E7 y la señal de retención de la calreticulina KDEL.

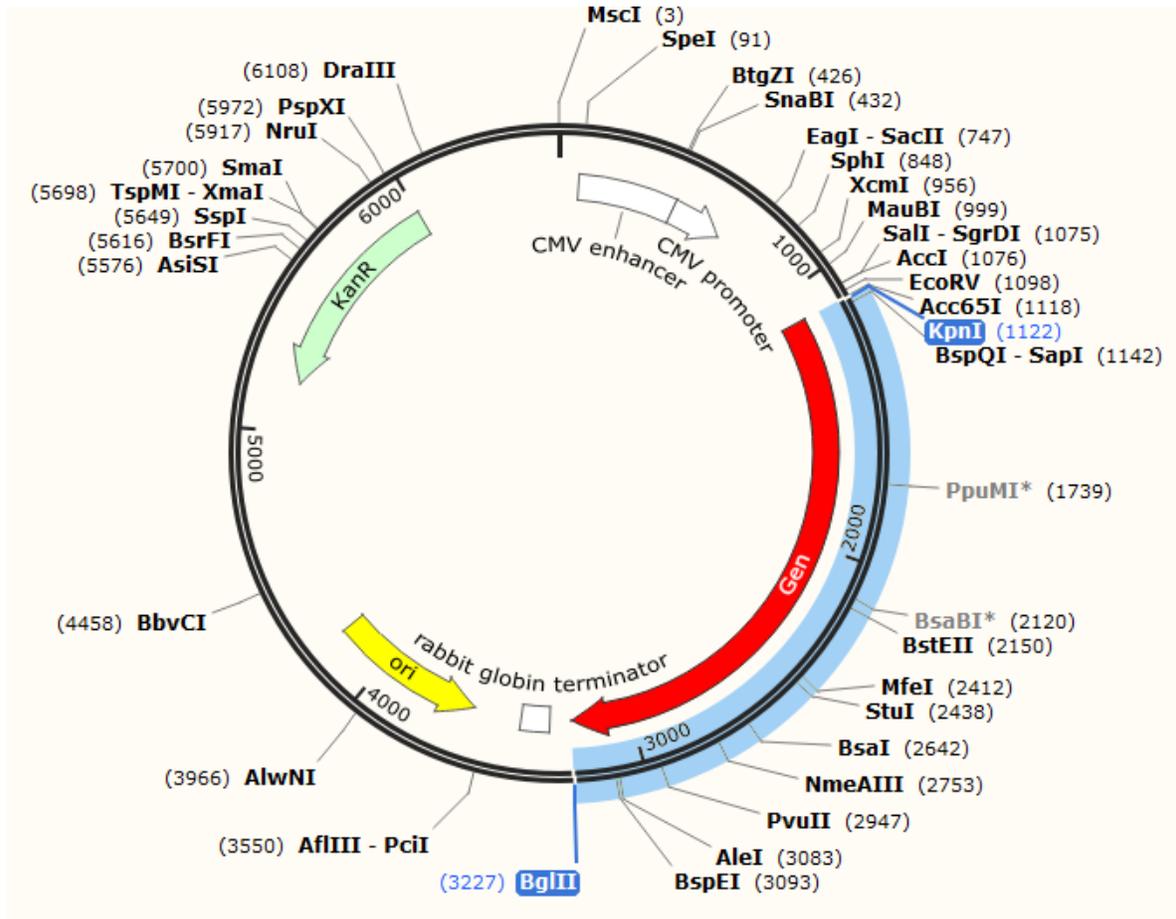


Figura 11. Diseño y estructura de la construcción con las proteínas COX-2 murina, E7 y la señal de retención de la calreticulina KDEL, con la delección de ERAD.

Posteriormente, a partir del plásmido COX2-E7 se deletó E7 mediante la digestión con la enzima de restricción *NsiI* y posterior ligación para cerrar el plásmido (Figura 12).



Figura 12. Estructura de la construcción con la proteína COX-2 murina, y la señal de retención de la calreticulina KDEL.

Para comprobar el diseño correcto de las construcciones, se realizaron digestiones con *KpnI* y *BglIII*, los cuales se diferencian por el peso aproximado que depende de las deleciones de E7 o ERAD respectivamente. Los productos de estas digestiones se corrieron en un gel *in silico* en el programa SnapGene 1.1.3 y uno de agarosa al 1.8% en TBE.

Análisis de expresión de proteínas de interés

Se sembraron 5×10^5 células HEK-293 en placas de 6 pozos con 4 ml de medio por pozo y se dejaron incubando durante 24 h. Posteriormente fueron transfectadas con 2 microgramos (μg) de ADN de las construcciones COX2-E7 y COX2-E7 Δ ERAD y se incubaron por un periodo de 0, 24, 48, 72 y 96 h.

Después se realizó un western blot (Wb) con objetivo de identificar que los plásmidos sean capaces de dirigir la expresión de las proteínas de interés. Se realizaron extractos con buffer de lisis de ProteoJet (50 μL) con inhibidor de proteasas, posteriormente se cuantificaron las proteínas a través del reactivo Pierce BCA de la compañía Thermo Fisher Scientific. Se cargaron 25 μg de los extractos y se corrieron en SDS-PAGE 80 v (volts) para realizar una transferencia en membranas de PVDF de Bio-Rad en cámara semi-humeda. Se bloquearon las membranas con leche descremada 10% durante una h y se realizaron 3 lavados en TBST

de 15 minutos c/u 4°C en agitación lenta. Se realizó la inmunodetección con los anticuerpos anti E7, anti COX-2 y anti β -Actina durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el anticuerpo y se realizaron otros tres lavados en TBST de 15 minutos c/u para posteriormente añadir el anticuerpo secundario anti-ratón durante 2 h. Posterior a ello se realizaron nuevamente 3 lavados en TBST para utilizar el reactivo de revelado West Pico (Thermo Fisher Scientific).

Una vez detectado el tiempo óptimo de expresión, se realizó otro ensayo de Wb con el fin de detectar las tres construcciones. Para ello se sembraron 5×10^5 células HEK-293 por pozo, 24 h después se transfectaron con 2 μ g de ADN, y se dejaron incubando por 48 h, posteriormente se levantaron los extractos para ser cuantificados y cargar 25 μ g de proteína por carril en SDS-PAGE, y ser transferidas en membrana para su posterior inmunodetección, con los anticuerpos antes mencionados.

Análisis de localización subcelular de las proteínas recombinantes

Para detectar la ubicación subcelular de las construcciones de interés, se realizaron transfecciones con las distintas construcciones en las células HEK-293, después del tiempo de incubación, se fijaron con metanol 100% durante 10 minutos a -20 °C y se permeabilizaron con acetona 100% 1 minutos a -20 °C para realizar inmunofluorescencias contra las proteínas E7, calnexina como marcador del RE y GRP78 como marcador de estrés en RE. Para ello se sembraron 2×10^4 células HEK-293 en laminillas de 8 celdas LabTek Chamber slides. Las células fueron transfectadas con 100 nanogramos (ng) de ADN en 0.4 μ l del reactivo TurboFect™. A las 48 h post transfección las células fueron fijadas con metanol al 100% por

10 minutos a -20°C , seguida de un lavado con acetona por 1 minuto a -20°C , y permeabilizadas con Tritón 100X al 0.5%, realizando lavados entre cada uno de los pasos con buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés); posteriormente se bloquearon con BSA al 1% durante 1 h. Al término del bloqueo se continuó con 3 lavados con buffer PBS para después agregar el anticuerpo primario (E7, calnexina y GRP78) durante toda la noche a 4°C . Al día siguiente se realizaron lavados y se añadieron los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos anti-ratón para E7 y anti-conejo para GRP78 y calnexina, dejando en incubación durante 2 h en completa oscuridad. Una vez terminada la incubación, se realizaron lavados y se dejaron incubando en DAPI a 0.1mg/mL durante 10 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad, una vez terminado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados en PBS y se montaron para observación al microscopio de fluorescencia.

Determinación de la vida media de las proteínas de interés

Se evaluó la vida media de las construcciones que llevan la proteína COX-2 de las distintas versiones. Para ello se sembraron 5×10^5 HEK-293, 24 h después se realizó la transfección con la construcción COX2-E7 y al paso de 44 h, se añadió cicloheximida (C7698, Sigma-Aldrich) a $20\ \mu\text{g/mL}$ como inhibidor de la traducción de proteínas durante 4h, posteriormente se cambió el medio por medio fresco para bloquear la inhibición. Se levantaron los extractos a los tiempos 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 h después de haber retirado el inhibidor y se analizó la vida media por Wb contra E7 y β -actina.

Biobalística

Para la producción de las vacunas de ADN se siguió el protocolo del sistema Helios Gene Gun System (BioRad). Se emplearon 25 mg de microcarries de oro del tamaño de 1 μm recubiertos con 50 μg de los plásmidos.

Ensayo profiláctico

Ratones de la cepa C57BL6 fueron tratados al día 0 y al día 7 con 1 μg de ADN (por ratón) mediante biobalística en grupos de 5 ratones por tratamiento. Posteriormente, al día 10 se les inyectaron las células tumorales TC-1 (5×10^4 células por ratón) de manera subcutánea. Se evaluó el efecto antitumoral mediante la medición del volumen tumoral cada tercer día (Figura 13).

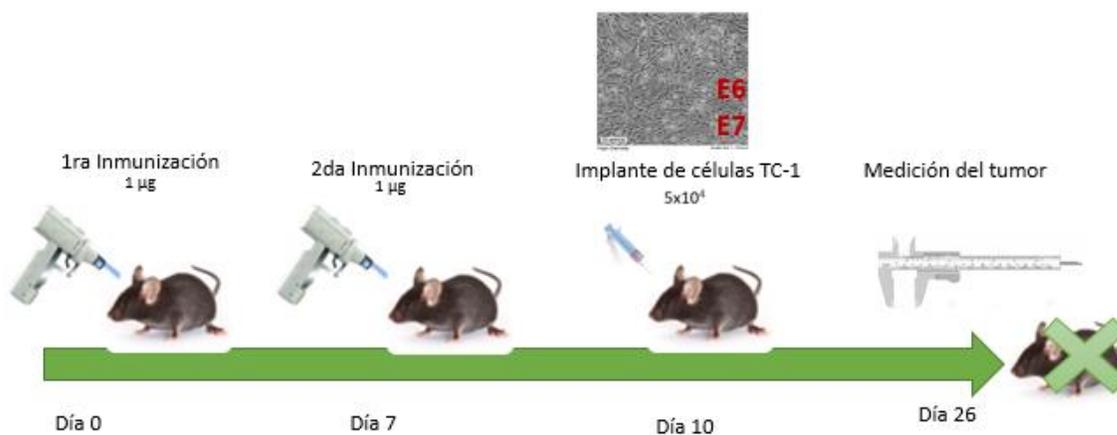


Figura 13. Esquema de ensayo profiláctico. Inmunizaciones, implantes tumorales, medición del tamaño del tumor y sacrificio a través del tiempo.

Ensayo terapéutico

Al día 3 y 10 se trataron con 1 μg de ADN (por ratón) mediante biobalística grupos de 5 ratones por tratamiento de la cepa C57BL/6 a los cuales previamente al día 0 se les inyectó las células tumorales TC-1 (5×10^4 células por ratón) de manera subcutánea. Se evaluó el efecto antitumoral mediante la medición del volumen tumoral cada tercer día (Figura 14).

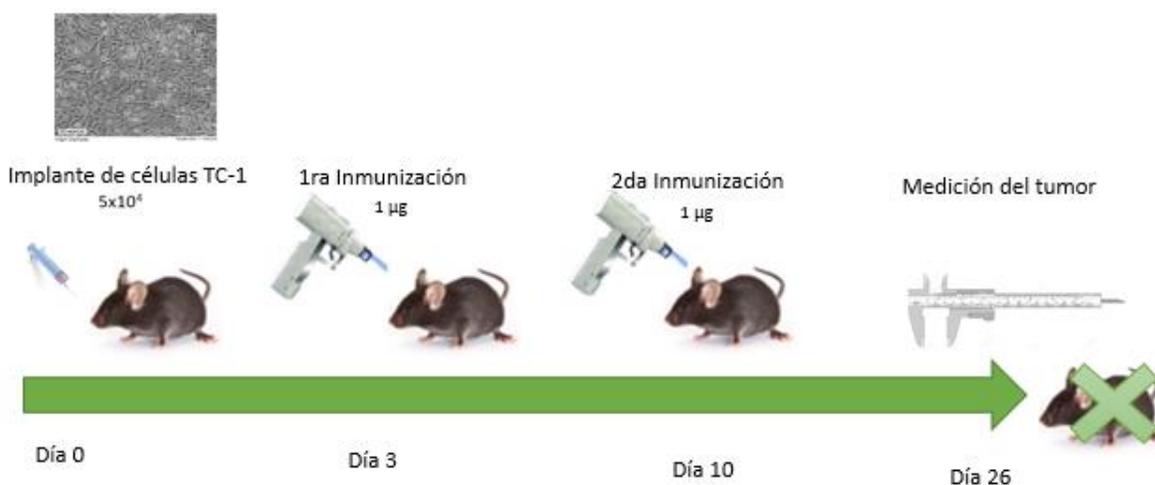


Figura 14. Esquema de ensayo terapéutico. Implantación celular, inmunizaciones, medición tumoral y sacrificio a través del tiempo.

Análisis estadístico

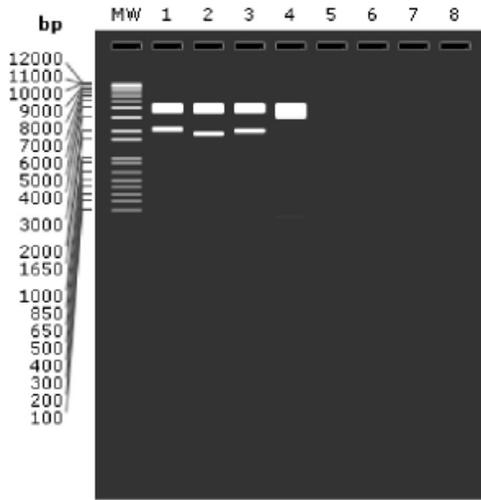
El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad 6, utilizando la prueba *t*-student y ANOVA para la comparación entre grupos. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

Caracterización de los plásmidos

Lo primero que se realizó fue la caracterización de los plásmidos, para demostrar que estos cuentan con las secuencias y los sitios de restricción diseñados en el programa Snap Gene. Para ello, primero se hizo una digestión con las enzimas *Bgl*III y *Kpn*I, los cuales flanquean los genes de interés. Estos se corrieron por electroforesis de ADN *in silico*, el patrón de bandeo fue comparado con el marcador de ADN, las bandas esperadas corresponden a 2168 pb, para la construcción COX2-E7 (carril 1), 1889 pb para la construcción COX2 (carril 2), 2105 pb para COX2 Δ ERAD (carril 3) y como control el vector vacío o pUMVC4a 28pb no visibles en el gel (carril 4) (Figura 15 A). Una vez realizada la caracterización *in silico*, se realizó *in vitro*, obteniendo los mismos resultados con lo cual se confirma la correcta caracterización de los plásmidos que se utilizarán en este proyecto (Figura 15 B).

A)



1.0% agarose

MW: 1 Kb Plus DNA Ladder

- 1: pUMVC4amCOX2completa.dna
KpnI + BglII
 - 1. 4451 bp = BglII (3290) - KpnI (1122)
 - 2. 2168 bp = KpnI (1122) - BglII (3290)
- 2: pUMVC4amCOX2completadeltaE7.dna
KpnI + BglII
 - 1. 4451 bp = BglII (3011) - KpnI (1122)
 - 2. 1889 bp = KpnI (1122) - BglII (3011)
- 3: pUMVC4amCOX2completadeltaERAD.dna
KpnI + BglII
 - 1. 4451 bp = BglII (3227) - KpnI (1122)
 - 2. 2105 bp = KpnI (1122) - BglII (3227)
- 4: pUMVC4a.dna
KpnI + BglII
 - 1. 4451 bp = BglII (1150) - KpnI (1122)
 - 2. 28 bp = KpnI (1122) - BglII (1150)

B)

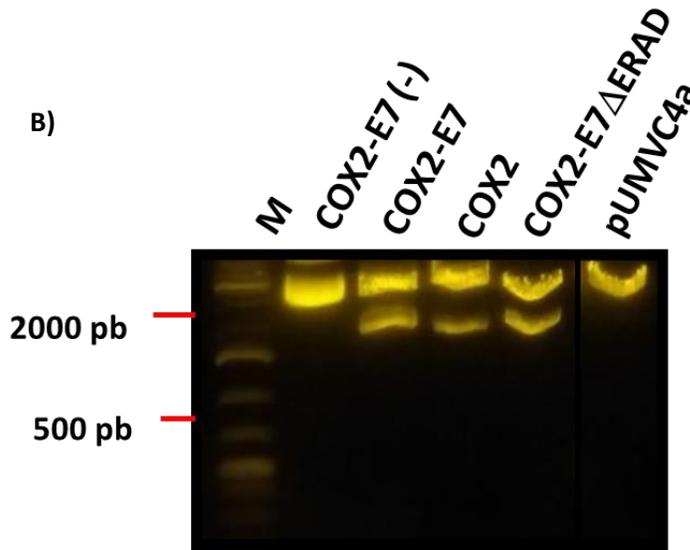


Figura 15. Caracterización de las construcciones de interés *in silico* e *in vitro*. A) La digestión de los plásmidos de interés se corrieron en una emulación con el programa SnapGene, el patrón de bandeos corresponde al tamaño de cada fragmento. B) Los plásmidos digeridos se corrieron en un gel de agarosa al 1%, obteniendo los mismos resultados que en el análisis *in silico*.

Análisis de la expresión de los plásmidos

Para el análisis de la expresión de los plásmidos células HEK-293 fueron transfectadas con 2 μ g de ADN con las construcciones COX2-E7 y COX2 Δ ERAD e incubadas a diferentes tiempos. Se obtuvieron los extractos de proteína y fueron analizados por Wb. Se observó para ambas construcciones la expresión de la proteína de fusión en el tamaño esperado de 72 kDa aproximadamente, al detectarla tanto con anticuerpos contra E7 como contra COX-2. Además, se observó que la expresión de la proteína llega a un pico máximo a las 48 h post transfección para ambas construcciones (COX2-E7 y COX2-E7 Δ ERAD) (Figura 16).

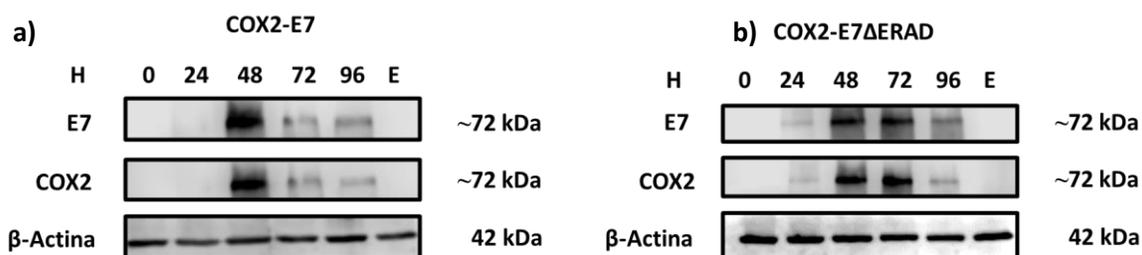


Figura 16. Curva de expresión de las construcciones COX2-E7 y COX2 Δ ERAD a través del tiempo. Células HEK-293 fueron transfectadas con 2 μ g de ADN de las diferentes construcciones y puestas a incubar a diferentes tiempos. A) Las células transfectadas con COX2-E7 mostraron un pico de expresión mayor al tiempo de 48 h. B) Aquellas células transfectadas con COX2 Δ ERAD mostraron una mayor expresión al tiempo de 48 y 72 h. Ambas muestras fueron analizadas por wb con la detección de las proteínas E7, COX2 y β -Actina como control de carga.

Una vez que se definió el tiempo óptimo de detección de las proteínas de fusión, se realizó otro Wb para detectar las tres construcciones al mismo tiempo. Para ello se utilizaron de igual manera células HEK-293 transfectadas con 2 μ g de ADN, a las 48 h se levantaron los extractos y se realizó la inmunodetección contra las proteínas E7, COX-2 y β -actina. En este

ensayo se observó que la construcción COX2 no expresa E7, pero si la proteína COX-2, como era de esperarse (Figura 17).

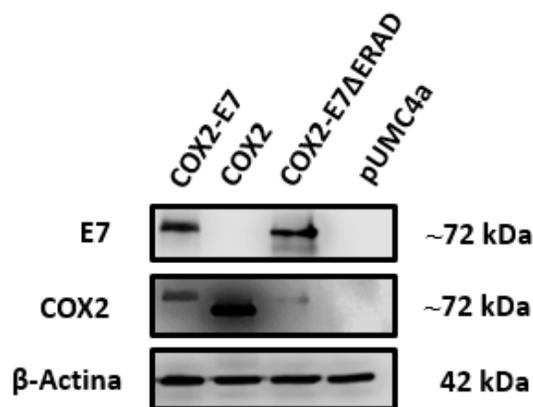


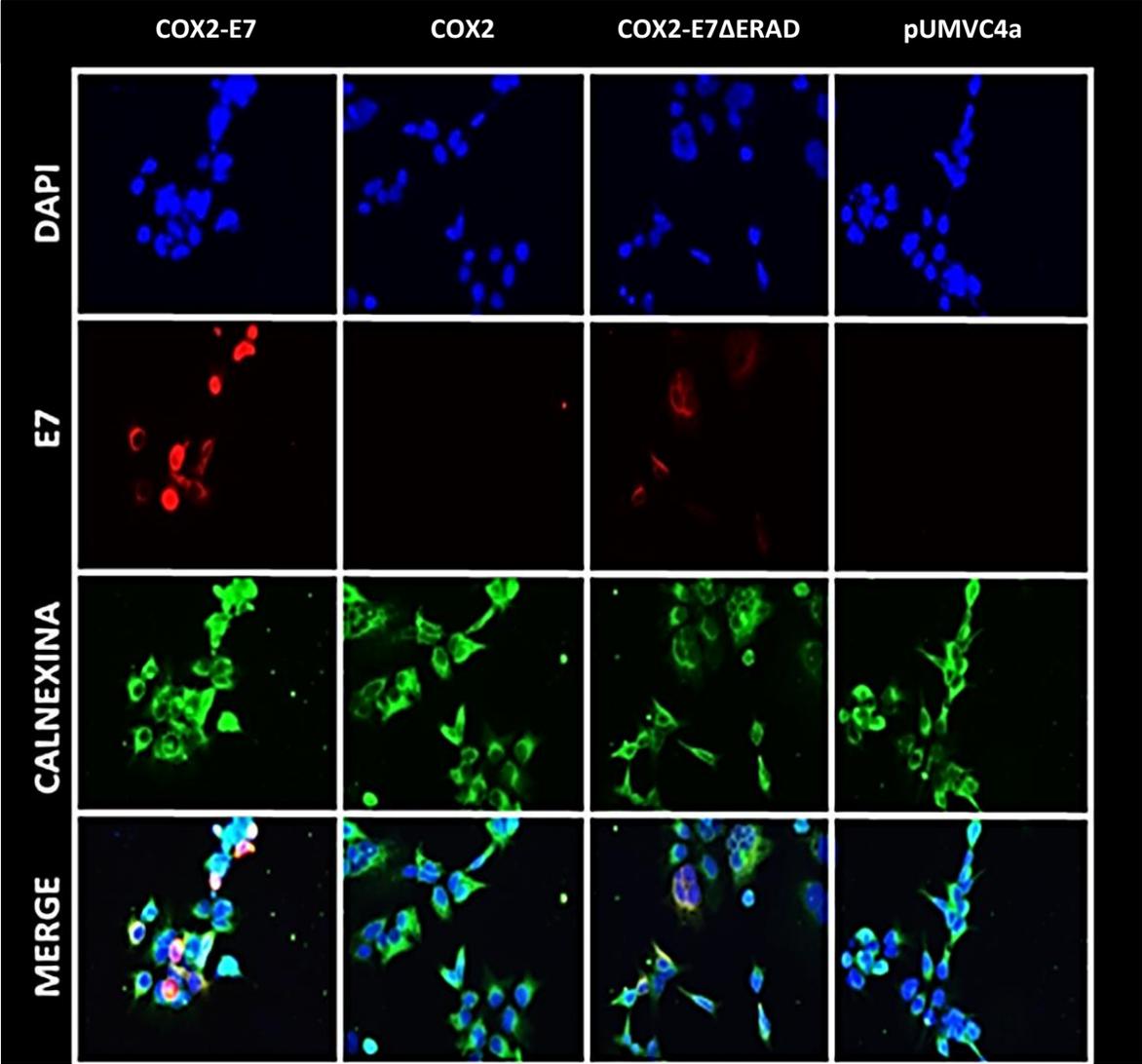
Figura 17. Detección de las proteínas recombinantes. Células HEK-293 fueron transfectadas, al paso de 48 h se obtuvieron los extractos de proteínas, que fueron corridas en un SDS-PAGE para su posterior inmunanálisis por Wb contra las proteínas E7, COX-2

Localización subcelular de las proteínas de fusión y activación de la respuesta a estrés en RE

Ya caracterizada la expresión de las proteínas, se realizó un ensayo por inmunofluorescencia, con el fin de corroborar el envío al RE y ver si existe una relación entre la expresión de las proteínas recombinantes con la chaperona GRP78/BiP, encargada de la homeostasis del RE bajo condiciones de estrés al activarse la UPR. Para ello se transfectaron células HEK-293 y al lapso de 48 h se procesaron para su detección respectiva. En este ensayo se observó que en aquellas células transfectadas con las construcciones de interés que contienen la proteína COX-2 fusionada a E7, dirigen la expresión al RE, esto confirmado al realizar una co-localización con la proteína calnexina, la cual es una chaperona residente del RE (Figura 18 A) (Ou et al., 1993; Tatu and Helenius, 1997). Además se observó que aquellas

construcciones que dirigen la expresión del antígeno E7 al RE, activan la respuesta a estrés, esto observado al detectar la sobreexpresión de la chaperona GRP78/BiP (Lee, 2005) (Figura 18 B).

A)



B)

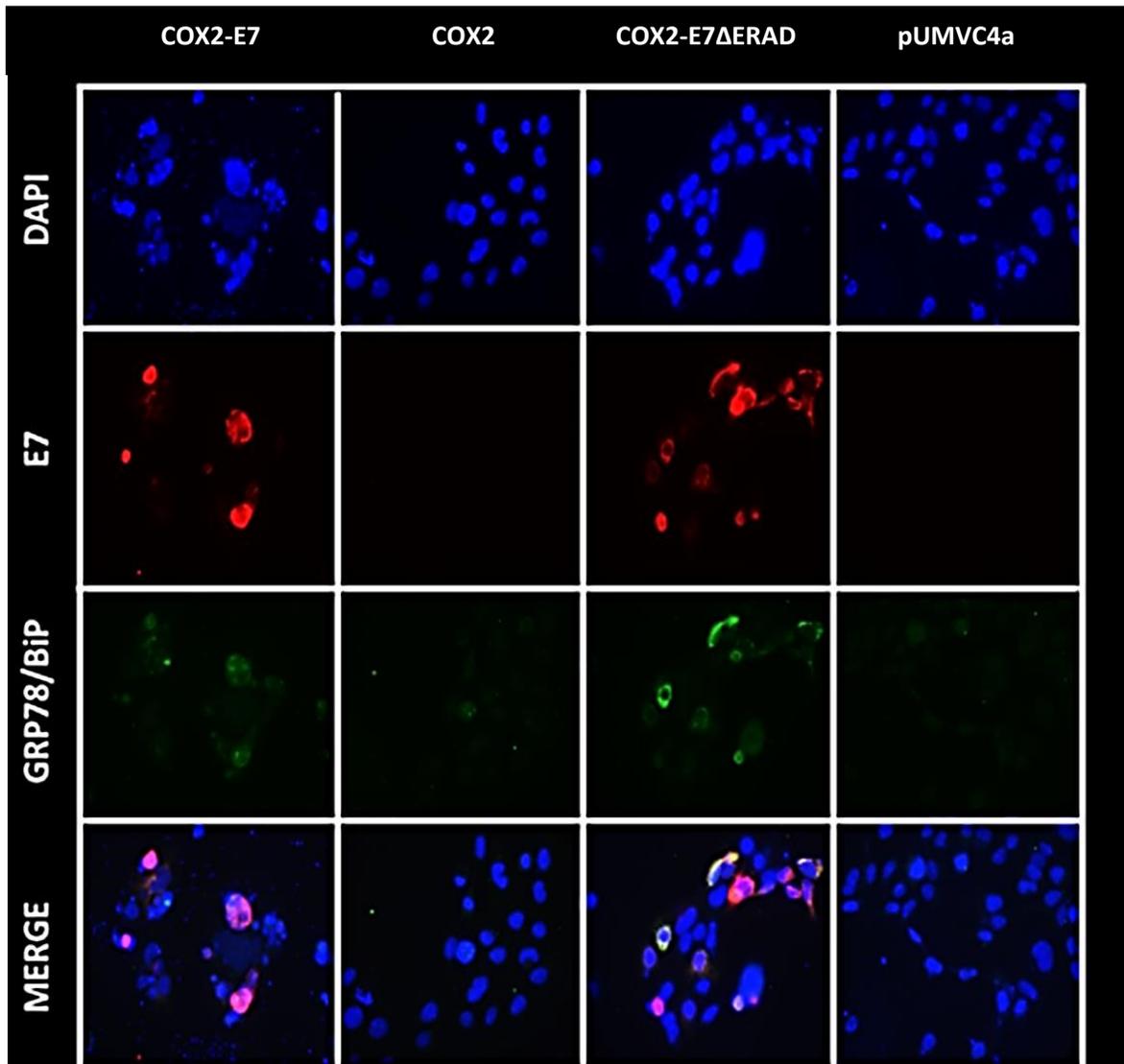


Figura 18. Análisis de la expresión y localización de las construcciones en el retículo endoplásmico. Células HEK-293, fueron transfectadas con las diferentes construcciones, 48 h después, se procesaron para inmunofluorescencia. A) Células transfectadas con las construcciones de interés (E7 en canal rojo), marcador de retículo endoplásmico (calnexina en canal verde). En la imagen del merge se puede apreciar ambas señales co-localizadas. B) Células transfectadas (E7 en el canal rojo), marcador de estrés en retículo endoplásmico (GRP78/BiP en el canal verde). Con el merge se puede corroborar la sobreexpresión del marcador de estrés principalmente en las células que expresan E7. Se utilizó DAPI para distinción nuclear para ambas figuras.

Vida media de COX2-E7

Después de confirmar el envío de las proteínas al RE y ver que la UPR se activa en mayor intensidad en las construcciones que contienen el antígeno E7, se analizó el tiempo de vida media de la COX2-E7. Se ha observado con anterioridad que la cicloheximida inhibe la unión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) a la subunidad 80S de los ribosomas libres, y no así a la de las proteínas sintetizadas en organelos (Obrig et al., 1971; Setkov et al., 1992; Suzuki et al., 1992). Los resultados obtenidos en el tiempo de vida media de la construcción COX2-E7 coinciden aparentemente con el tiempo de vida media teórico de la proteína COX-2 silvestre, estos resultados muestran cómo va en aumento la expresión de la proteína al quitar el inhibidor de la síntesis de estas (tiempo 0), mostrando un pico máximo al tiempo de 1.5 h y decayendo drásticamente al tiempo de 2 h (Figura 19).

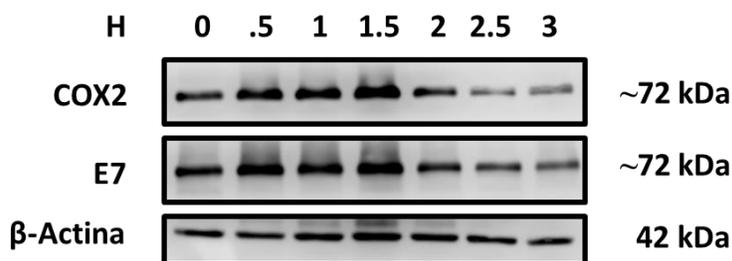
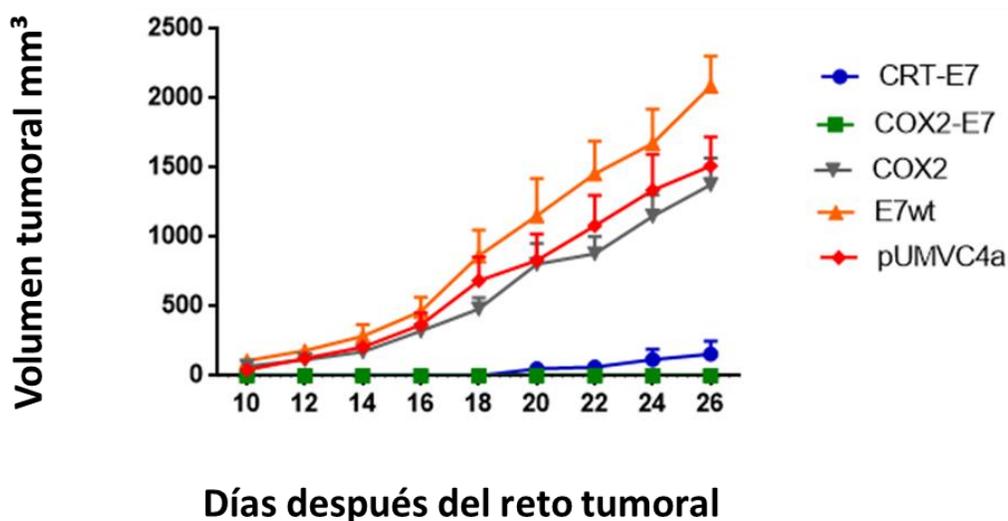


Figura 19. Vida media de COX2-E7. Células HEK, fueron transfectadas con el plásmido COX2-E7, 44 h post transfección se les incluyó la cicloheximida, como inhibidor de la síntesis de proteínas, 4 h post incubación se retiró el inhibidor y se levantaron extractos al tiempo de 0, .5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 h. Posteriormente se inmunodetectaron en Wb con COX-2, E7 y β -Actina como control de carga.

Análisis del efecto profiláctico y terapéutico

Posterior a la caracterización de las construcciones, se procedió con los ensayos *in vivo*, profilácticos y terapéuticos. Ratones de la cepa C57BL/6 fueron utilizados para los tres tipos de estudios. En los ensayos profilácticos los ratones fueron tratados a partir de la semana 7 de nacimiento con 1 μ g de ADN con las construcciones: CRT, E7wt, COX2-E7, COX2, COX2-E7 Δ ERAD y el vector vacío pUMVC4a, por medio de la técnica de biobalística. Siete días después, con el fin de evaluar el efecto inmunoprotector, se realizó la segunda inmunización y al día 10 se realizó el implante tumoral con la línea celular TC-1. Posterior a ello se realizaron mediciones del crecimiento tumoral. Los datos obtenidos tras los ensayos profilácticos muestran un efecto antitumoral significativo para las construcciones CRT-E7, COX2-E7 y COX2-E7 Δ ERAD, comparadas contra E7wt y pUMVC4a, cabe destacar que este efecto se vio de mejor manera al tiempo de 26 días después de la inmunización (Figura 20).

A)



B)

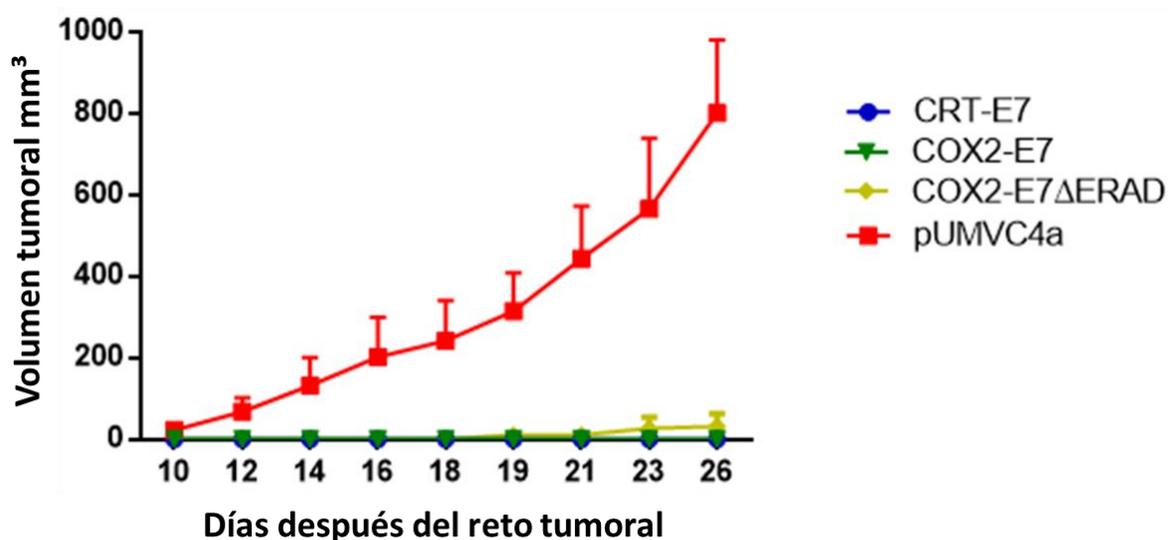


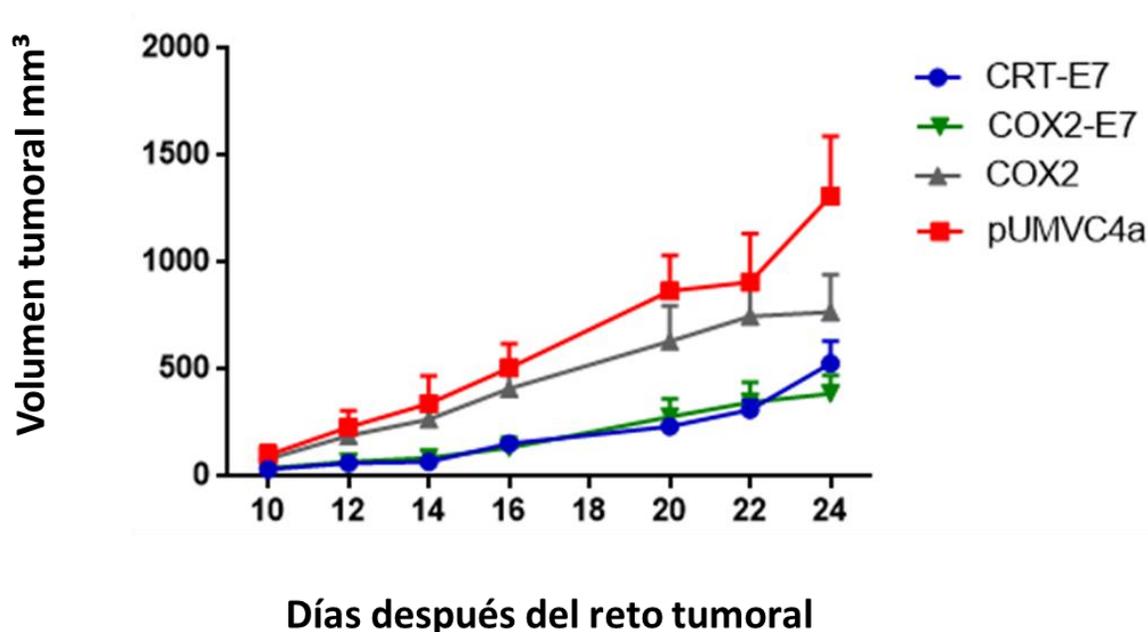
Figura 20. Ensayos profilácticos. Grupos de 5 ratones hembra de la cepa C57BL/6 fueron tratados con las diferentes construcciones plasmídicas: CRT-E7, COX2-E7, COX2, E7wt, COX2-E7ΔERAD y pUMVC4a por medio de biobalística en una concentración de 1 µg de ADN por cada ratón. Después del implante de la línea TC-1 fueron medidos los tumores desde el día 10 hasta el día 26. A) Medición tumoral de ratones tratados con: CRT-E7, COX2-E7, COX2, E7wt y pUMVC4a, B) Medición tumoral de ratones tratados con: CRT-E7, COX2-E7, E7wt, COX2-E7ΔERAD y pUMVC4a.

En estudios anteriores de terapia génica antitumoral se ha mostrado que al realizar la fusión de la chaperona calreticulina al antígeno E7 mejora significativamente la respuesta (Cheng et al., 2001; Kim et al., 2004), por ello nosotros utilizamos esta fusión como control para comparar su efecto contra la fusión de COX2-E7 con y sin la secuencia de degradación ERAD.

Para corroborar la eficacia de las construcciones génicas, se estableció el modelo terapéutico, en el cual a los ratones se les implantaron 5×10^5 células de la línea TC-1, recordando que esta se encuentra modificada del tal manera que contiene los genes de los antígenos E6 y E7 del VPH-16, para extrapolar el modelo antitumoral del cáncer cervicouterino. Para los días 3 y 10, se realizaron los tratamientos con las construcciones de interés con 1 µg de ADN por

medio de la técnica de biobalística. Se tomaron mediciones de los tumores del día 10 al día 26, esto debido a que se presentaron tumores de más de 1500 mm³ en el control negativo. Los datos arrojan que existe una diferencia significativa de las construcciones: CRT-E7, COX2-E7 y COX2-E7ΔERAD comparadas con E7wt y pUMVC4a, al igual que en los ensayos profilácticos, lo que corrobora el efecto antitumoral de las construcciones COX2-E7 y COX2-E7ΔERAD, comparado con el control CRT-E7. Además, se observó que el efecto de COX2-E7ΔERAD, es aún más eficiente que el de las construcciones COX2-E7 y CRT-E7 (Figura 21).

A)



B)

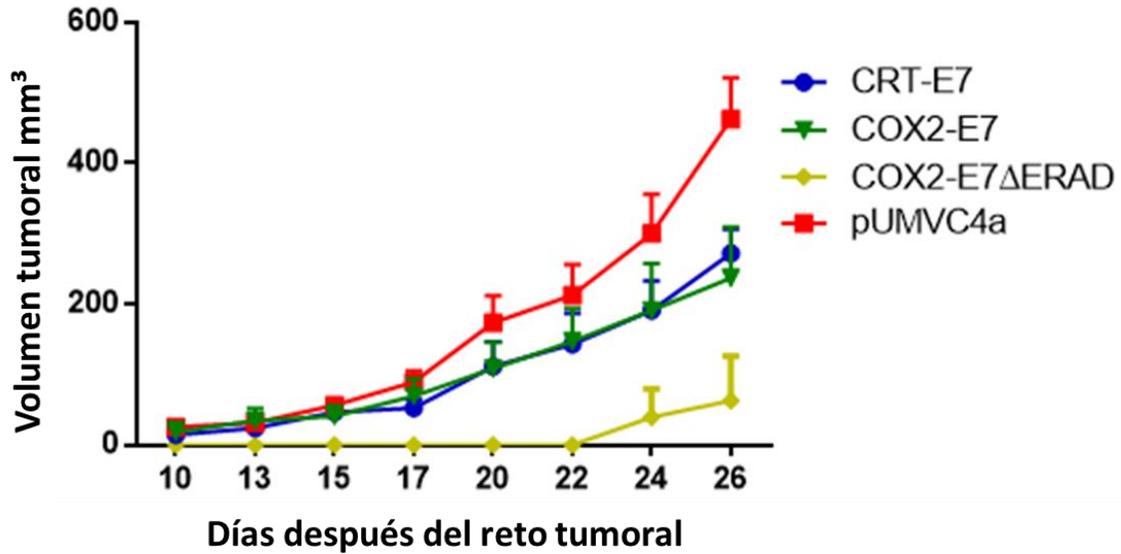


Figura 21. Ensayos Terapéuticos. Grupos de 5 ratones hembra de la cepa C57BL/6 les fueron implantadas células de la línea TC-1, a los días 3 y 10 fueron tratados con las diferentes construcciones plasmídicas: CRT-E7, COX2-E7, COX2, E7wt, COX2-E7ΔERAD y pUMVC4a por medio de biobalística en una concentración de 1 μ g de ADN por cada ratón. a partir del día 10 fueron medidos los tumores hasta el día 26. A) Medición tumoral de ratones tratados con: CRT-E7, COX2-E7, COX2, E7wt y pUMVC4a, B) Medición tumoral de ratones tratados con: CRT-E7, COX2-E7, E7wt, COX2-E7ΔERAD y pUMVC4a.

DISCUSIÓN

La terapia génica es una estrategia muy prometedora debido a que a través de ella se ha observado la estimulación del sistema inmune contra el cáncer con características poco inmunogénicas, esto aunado al uso de la fusión de antígenos de interés a proteínas que dirigen la expresión de estos al RE.(Cheng et al., 2001; Gomez-Gutierrez et al., 2007; Kim et al., 2004).

En este proyecto se probó el uso del antígeno E7 del VPH-16 fusionado a la proteína COX-2, la cual es una proteína que posee un casete de degradación por la vía ERAD para evaluar su efecto sobre la inducción de una respuesta antitumoral y compararlo con el efecto de la fusión de E7 a la proteína calreticulina, la cual es una fusión que posee un efecto antitumoral bien caracterizado.

Experimentalmente se demostró que la fusión del antígeno E7 a la proteína COX-2 dirige la expresión del antígeno al RE (figura 18 A). Este dato muestra que la fusión del antígeno a proteínas residentes del RE puede dirigir su expresión en este organelo. Sin embargo, falta determinar si el tipo de proteína al que se fusiona podría tener algún efecto antitumoral y si este será diferente dependiendo de la proteína a la que se fusiona y sus propiedades. Estas inferencias surgen al ver los modelos antitumorales y los mecanismos de degradación de antígenos enviados al RE en trabajos previos (Loera-Arias et al., 2010; Martínez Puente, 2016; Oosterhuis et al., 2012; Pérez-Trujillo et al., 2018).

Al observar estos datos, nos cuestionamos si al igual que con calreticulina y las señales de envío y retención de esta proteína, la fusión de COX-2 a E7 activa la respuesta a estrés en el RE. Los datos obtenidos en este trabajo mostraron que efectivamente aquellas construcciones que dirigen la expresión del antígeno E7 al RE activan esta respuesta. Estos datos son sustentados por la sobreexpresión de GRP78 (Figura 18 B), la cual se ha reportado está asociada directamente a la acumulación de proteínas y a la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (Feng et al., 2014; Lee, 2005). Diferentes estudios han mostrado el papel de las chaperonas en la presentación cruzada de antígenos en células bajo factores de estrés en RE (Li et al., 2002; Osorio et al., 2014; Udono et al., 2009), aumentando la probabilidad de exponer epítomos de antígenos extraños ante el sistema inmune a través del MHC-I mejorando la respuesta inmune. Por lo anterior, despertar una respuesta a estrés en el RE, y la sobreexpresión de la chaperona GRP78 podría mejorar la presentación de antígenos dirigidos a este organelo.

COX-2 cuenta con una vida media de 2 h, debido a su casete de degradación de 19 aa (Mbonye et al., 2006). Al analizar la vida media de COX2-E7 en los ensayos de tiempo con el inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida demostramos que la fusión con el antígeno E7 no afecta la vida media de COX-2, es decir que la fusión de la proteína mantiene la vida media de COX-2 de 2 h reportada en la literatura (Figura 19) (Schneider-Poetsch et al., 2010).

Para los ensayos en murinos se usaron las construcciones de CRT-E7, COX2, COX2-E7, COX2-E7 Δ ERAD y el vector vacío pUMVC4a, esto con el fin de estudiar el efecto antitumoral que tienen nuestras variantes de COX-2 contra el estándar de calreticulina

(Gomez-Gutierrez et al., 2007), y contra estas mismas, viendo la importancia de cada uno de los componentes de las construcciones.

En un ensayo profiláctico, analizando la importancia del antígeno E7 dirigido al RE en respuestas antitumorales, observamos que en aquellos ratones tratados con construcciones que dirigen la expresión del antígeno E7 a este organelo les confiere un efecto antitumoral de manera significativa, comparado con aquellos ratones tratados con las construcciones que no dirigen E7 al RE o al control negativo (Figura 20 A).

Se observó un crecimiento tumoral muy significativo entre los ratones tratados con el vector vacío y los tratados con las construcciones de interés, mientras que las variantes de COX-2 mostraron un efecto muy similar al de los ratones tratados con CRT-E7, estos resultados muestran la correlación entre dirigir antígenos al RE y el efecto antitumoral, algo previamente reportado en modelos de terapia génica (Kim et al., 2004).

Al observar estos datos, se realizó otro ensayo profiláctico antitumoral, donde se analizó el efecto de las variantes de COX-2 con E7 vs CRT-E7 y pUMVC4a, similarmente observamos el crecimiento tumoral en aquellos ratones tratados con el vector vacío pUMVC4a, mientras que entre las variantes de COX-2 con E7 y CRT-E7 mostraron un efecto antitumoral de manera eficiente y muy similar (Figura 20 B).

Después de analizar los datos del efecto antitumoral de manera profiláctica se decidió realizar un ensayo antitumoral de manera terapéutica, esto con el fin de ver si las construcciones confieren un efecto protector después del establecimiento de los tumores. Los datos

mostraron la importancia de la fusión del antígeno E7 a COX-2, se obtuvo que la respuesta antitumoral es específica de E7 y no de COX-2 por sí misma (Figura 21 A). Nuestros resultados mostraron de manera muy satisfactoria un efecto protector antitumoral muy similar al de la construcción CRT-E7, para el caso de la construcción COX2-E7 y mayor al de pUMVC4a. Además, de manera interesante, se observó una reducción estadísticamente significativa de los tumores más eficiente con la construcción COX2-E7 Δ ERAD (Figura 21 B). Esto podría deberse a que el efecto es dependiente de la fusión de E7 a proteínas del RE, provocando un estrés y activando vías de degradación para la recuperación de la homeostasis en este organelo. Este efecto podría estar siendo sobrepasado (o podría ser más eficiente), que el efecto de la señal ERAD. Sin embargo, se necesitará realizar más ensayos a futuro con un mayor número de ratones para corroborar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

1. La fusión de COX-2 a E7 dirige su expresión en retículo endoplásmico.
2. La fusión de COX-2 a E7 induce una respuesta a estrés en retículo endoplásmico.
3. La proteína COX-2 fusionada a E7 mantiene su vida media de degradación.
4. La proteína COX-2 posee un efecto antitumoral similar a calreticulina.
5. La fusión de proteína COX2 Δ ERAD confiere un efecto antitumoral terapéutico más eficiente que CRT-E7 Y COX2-E7.

LITERATURA CITADA

- American Cancer Society (2018). ¿Qué es cáncer de cuello uterino (cervical)?
- Araki, K., and Nagata, K. (2011). Protein Folding and Quality Control in the ER. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Baiceanu, A., Mesdom, P., Lagouge, M., and Foufelle, F. (2016). Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 710–722.
- Barrón, A., Aranda, C., Valenzuela, S., Paredes, Y., and Villegas, H. (2004). Infección cervical por virus del papiloma humano: genotipificación por hibridación in situ y análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión. *Perinatol. Reprod. Humana* 18, 208–216.
- Boyer, S.N., Wazer, D.E., and Band, V. (1996). E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cancer Res.* 56, 4620–4624.
- Braaten, K.P., and Laufer, M.R. (2008). Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev. Obstet. Gynecol.* 1, 2–10.
- Brodsky, J.L. (2012). Cleaning Up: ER-Associated Degradation to the Rescue. *Cell* 151, 1163–1167.
- Brostrom, C.O., and Brostrom, M.A. (1998). Regulation of translational initiation during cellular responses to stress. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 58, 79–125.
- de Bruyn, M., Wiersma, V.R., Helfrich, W., Eggleton, P., and Bremer, E. (2015). The ever-expanding immunomodulatory role of calreticulin in cancer immunity. *Front. Oncol.* 5, 35.
- Burd, E.M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 1–17.
- Callejas, D. (2011). Caracterización de la respuesta inmunitaria- inflamatoria en el cuello uterino en pacientes con displasias de cervix. Universidad de Alcalá.
- Chang, E.Y., Chen, C.H., Ji, H., Wang, T.L., Hung, K., Lee, B.P., Huang, A.Y., Kurman, R.J., Pardoll, D.M., and Wu, T. (2000). Antigen-specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogeneic tumor cell-based vaccine. *Int. J. Cancer* 86, 725–730.
- Chaplin, D.D. (2010). Overview of the Immune Response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3-23.
- Chaput, N., Botton, S.D., Obeid, M., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Panaretakis, T., Flament, C., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference. *J. Mol. Med.* 85, 1069–1076.

Chen, C.H., Suh, K.W., Ji, H., Choti, M.A., Pardoll, D.M., and Wu, T.C. (2000). Antigen-specific immunotherapy for human papillomavirus 16 E7-expressing tumors grown in the liver. *J. Hepatol.* *33*, 91–98.

Cheng, W.-F., Hung, C.-F., Chai, C.-Y., Hsu, K.-F., He, L., Ling, M., and Wu, T.-C. (2001). Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J. Clin. Invest.* *108*, 669–678.

Cheng, W.-F., Hung, C.-F., Chen, C.-A., Lee, C.-N., Su, Y.-N., Chai, C.-Y., Boyd, D.A.K., Hsieh, C.-Y., and Wu, T.-C. (2005). Characterization of DNA vaccines encoding the domains of calreticulin for their ability to elicit tumor-specific immunity and antiangiogenesis. *Vaccine* *23*, 3864–3874.

de la Cruz, E., Mohar, A., and Lizano Soberón, M. (2004). Elementos víricos y celulares que intervienen en el proceso de replicación del virus del papiloma humano. *Clin. Transl. Oncol.* *06*, 263–271.

Dachs, G.U., Dougherty, G.J., Stratford, I.J., and Chaplin, D.J. (1997). Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol. Res.* *9*, 313–325.

Feng, J., Chen, X., Sun, X., Wang, F., and Sun, X. (2014). Expression of endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP induced by oxidative stress in blue light-mediated damage of A2E-containing retinal pigment epithelium cells. *Ophthalmic Res.* *52*, 224–233.

Fink, A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* *79*, 425–449.

Globocan (2012). Fact Sheets by Population.

Gómez, J.G., Elpek, K.G., Montes de Oca-Luna, R., Shirwan, H., Sam Zhou, H., and McMasters, K.M. (2007). Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *56*, 997–1007.

Gomez-Gutierrez, J.G., Elpek, K.G., Montes de Oca-Luna, R., Shirwan, H., Sam Zhou, H., and McMasters, K.M. (2007). Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *56*, 997–1007.

Hausen, H. zur (2000). Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 690–698.

Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 89–102.

Joshi, N.S., and Kaech, S.M. (2008). Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *180*, 1309–1315.

- Kim, J.W., Hung, C.-F., Juang, J., He, L., Kim, T.W., Armstrong, D.K., Pai, S.I., Chen, P.-J., Lin, C.-T., Boyd, D.A., et al. (2004). Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Ther.* *11*, 1011–1018.
- Lee, A.S. (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods San Diego Calif* *35*, 373–381.
- Li, Z., Menoret, A., and Srivastava, P. (2002). Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* *14*, 45–51.
- Loera-Arias, M.J., Martínez-Pérez, A.G., Barrera-Hernández, A., Ibarra-Obregón, E.R., González-Saldívar, G., Martínez-Ortega, J.I., Rosas-Taraco, A., Villanueva-Olivo, A., Esparza-González, S.C., Villatoro-Hernandez, J., et al. (2010). Targeting and retention of HPV16 E7 to the endoplasmic reticulum enhances immune tumour protection. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 890–894.
- Macario, A.J.L., and Conway de Macario, E. (2007). Chaperone Proteins and Chaperonopathies. In *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*, G. Fink, ed. (New York: Academic Press), pp. 438–444.
- Martínez Puente, D.H. (2016). Estudio del mecanismo de degradación de antígenos del VPH-16 enviados y retenidos en retículo endoplásmico. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Mbonye, U.R., Wada, M., Rieke, C.J., Tang, H.-Y., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (2006). The 19-amino Acid Cassette of Cyclooxygenase-2 Mediates Entry of the Protein into the Endoplasmic Reticulum-associated Degradation System. *J. Biol. Chem.* *281*, 35770–35778.
- Meijide, G., A, J., Carnota, G.-R., and J, J. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Rev. Esp. Reumatol.* 33–35.
- Neefjes, J., and Ovaa, H. (2013). A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system. *Nat. Chem. Biol.* *9*, nchembio.1391.
- Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeehan, W.L., and Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* *246*, 174–181.
- Oosterhuis, K., Aleyd, E., Vrijland, K., Schumacher, T.N., and Haanen, J.B. (2012). Rational design of DNA vaccines for the induction of human papillomavirus type 16 E6- and E7-specific cytotoxic T-cell responses. *Hum. Gene Ther.* *23*, 1301–1312.
- Osowski, C.M., and Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* *490*, 71–92.
- Osorio, F., Tavernier, S.J., Hoffmann, E., Saeys, Y., Martens, L., Vettters, J., Delrue, I., De Rycke, R., Parthoens, E., Pouliot, P., et al. (2014). The unfolded-protein-response sensor IRE-1 α regulates the function of CD8 α ⁺ dendritic cells. *Nat. Immunol.* *15*, 248–257.

Ou, W.J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (1993). Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* 364, 771–776.

Pennock, N.D., White, J.T., Cross, E.W., Cheney, E.E., Tamburini, B.A., and Kedl, R.M. (2013). T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Adv. Physiol. Educ.* 37, 273–283.

Perez-Trujillo, J.J., Garza-Morales, R., Barron-Cantu, J.A., Figueroa-Parra, G., Garcia-Garcia, A., Rodriguez-Rocha, H., Garcia-Juarez, J., Muñoz-Maldonado, G.E., Saucedo-Cardenas, O., Montes-De-Oca-Luna, R., et al. (2017). DNA vaccine encoding human papillomavirus antigens flanked by a signal peptide and a KDEL sequence induces a potent therapeutic antitumor effect. *Oncol. Lett.* 13, 1569–1574.

Pérez-Trujillo, J.J., Robles-Rodríguez, O.A., Garza-Morales, R., García-García, A., Rodríguez-Rocha, H., Villanueva-Olivo, A., Segoviano-Ramírez, J.C., Esparza-González, S.C., Saucedo-Cárdenas, O., Montes-de-Oca-Luna, R., et al. (2018). Antitumor Response by Endoplasmic Reticulum-Targeting DNA Vaccine Is Improved by Adding a KDEL Retention Signal. *Nucleic Acid Ther.*

Peter Bull Art Studio Peter Bull Art Studio.

Rangel-Colmenero, B.R., Gomez-Gutierrez, J.G., Villatoro-Hernández, J., Zavala-Flores, L.M., Quistián-Martínez, D., Rojas-Martínez, A., Arce-Mendoza, A.Y., Guzmán-López, S., Montes-de-Oca-Luna, R., and Saucedo-Cárdenas, O. (2014). Enhancement of Ad-CRT/E7-mediated antitumor effect by preimmunization with *L. lactis* expressing HPV-16 E7. *Viral Immunol.* 27, 463–467.

Rincón, O.L., Pareja, L.R., Jaramillo, S., and Aristizábal, B.H. (2007). Human papillomavirus, immune response and cervical cancer: a complex relationship. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 58, 202–212.

Roman, A., and Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445, 138–168.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2009). Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur. J. Immunol.* 39, 2076–2082.

Sanders, R. (2014). New front in war on Alzheimer's, other protein-folding diseases | Research UC Berkeley.

Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* 6, 209–217.

Setkov, N.A., Kazakov, V.N., Rosenwald, I.B., Makarova, G.F., and Epifanova, O.I. (1992). Protein synthesis inhibitors, like growth factors, may render resting 3T3 cells competent for DNA synthesis: a radioautographic and cell fusion study. *Cell Prolif.* 25, 181–191.

Sheng, W., Chen, C., Dong, M., Zhou, J., Liu, Q., Dong, Q., and Li, F. (2014). Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. *J. Cell. Physiol.* *229*, 887–897.

Shi, W., Bu, P., Liu, J., Polack, A., Fisher, S., and Qiao, L. (1999). Human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine: mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and antitumor activity. *J. Virol.* *73*, 7877–7881.

Simmons, D.L., Botting, R.M., and Hla, T. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol. Rev.* *56*, 387–437.

Suzuki, N., Suzuki, T., Uchida, A., Thompson, E.A., and Hosoya, T. (1992). Effect of dexamethasone on nucleolar casein kinase II activity and phosphorylation of nucleolin in lymphosarcoma P1798 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *42*, 305–312.

Tatu, U., and Helenius, A. (1997). Interactions between Newly Synthesized Glycoproteins, Calnexin and a Network of Resident Chaperones in the Endoplasmic Reticulum. *J. Cell Biol.* *136*, 555–565.

Tsai, Y.C., and Weissman, A.M. (2010). The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer* *1*, 764–778.

Udono, H., Ichiyangi, T., Mizukami, S., and Imai, T. (2009). Heat shock proteins in antigen trafficking--implications on antigen presentation to T cells. *Int J Hipertermia.* *25*, 617–625.

Vembar, S.S., and Brodsky, J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 944–957.

de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., and zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* *324*, 17–27.

Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* *115*, 2656–2664.

Yen, M.-C., and Lai, M.-D. (2013). Biolistic DNA delivery to mice with the low pressure gene gun. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *940*, 169–174.

Yewdell, J.W. (2001). Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* *11*, 294–297.

Yokoyama, M., and Hirata, K. (2005). New Function of Calreticulin: Calreticulin-Dependent mRNA Destabilization. *Circ. Res.* *97*, 961–963.

Zheng, Z.-M., and Baker, C.C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *11*, 2286–2302.