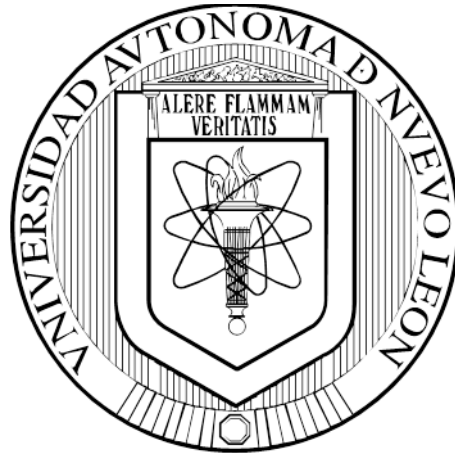


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO DE UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO QUE EXPRESE  
EL ADYUVANTE 4-1BBL FUSIONADO AL ANTÍGENO E7**

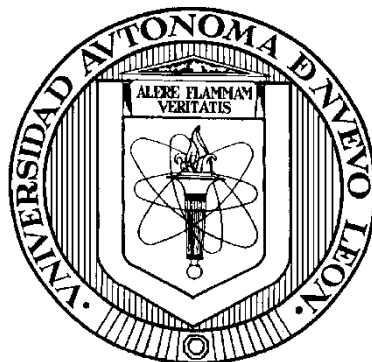
**POR**

**ALEJANDRA GUADALUPE MARTÍNEZ PÉREZ**

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

**JUNIO, 2019**

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



**DESARROLLO DE UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO QUE EXPRESE EL  
ADYUVANTE 4-1BBL FUSIONADO AL ANTÍGENO E7**

**Por**

**ALEJANDRA GUADALUPE MARTÍNEZ PÉREZ**

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

**JUNIO/2019**

**“DESARROLLO DE UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO QUE EXPRESE EL  
ADYUVANTE 4-1BBL FUSIONADO AL ANTÍGENO E7”**

Aprobación de tesis:



---

**Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna**  
Director



---

**Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas**  
Co- Director



---

**Dra. C. María de Jesús Loera Arias**  
Comisión de tesis



---

**Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de estudios de posgrado

**“DESARROLLO DE UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO QUE EXPRESE EL  
ADYUVANTE 4-1BBL FUSIONADO AL ANTÍGENO E7”**

Presentado por

**M.C.P. ALEJANDRA GUADALUPE MARTÍNEZ PÉREZ**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna, en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste bajo la co-dirección de la Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas. Así como en la Universidad de Louisville con la colaboración del Dr. Jorge

Guillermo Gómez Gutiérrez.



---

**Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna**  
Director



---

**Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas**  
Co- Director

*“Dondequiera que el arte de la medicina es amado,  
se ama también a la humanidad”*

*Hipócrates*

## **DEDICATORIA**

A el amor más grande y puro que he conocido y al pequeño torbellino fruto de  
ese amor, por ser mi motivo cada mañana...

...con todo mi amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por sembrar en mi el interés por la investigación científica, recibirme en su laboratorio y dirigirme en este proyecto. Así como a la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la Dra. María de Jesús Loera Arias por sus valiosas aportaciones y asesorías brindadas durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. José Juan Pérez Trujillo por su increíble paciencia y apoyo en el desarrollo experimental, así como al Dr. Jorge Guillermo Gómez Gutiérrez y al M.C.P Rodolfo Garza Morales por su valiosa colaboración.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A mis amigos de laboratorio Abigail, Yareth, Sheila, Daniel, David, Alfredo y Adrián por compartir el día a día. Así como al personal del Departamento de Histología.

A mi familia por el apoyo incondicional que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

## RESUMEN

M.C.P. Alejandra Guadalupe Martínez Pérez  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Fecha de titulación: Junio 2019

**Título del estudio: DESARROLLO DE UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO QUE EXPRESE EL ADYUVANTE 4-1BBL FUSIONADO AL ANTÍGENO E7**

**Páginas del estudio: 54**

**Área del estudio: Morfología**

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

### **Propósito y método del estudio:**

El presente trabajo tiene como finalidad expresar el sistema adyuvante SA/E7/4-1BBL en el contexto de una terapia génica adenoviral. Se ha descrito que la unión del ligando 4-1BBL a su receptor en células dendríticas ocasiona efectos pleiotrópicos en el sistema inmune innato, adaptativo y regulatorio. Se ha creado una forma quimérica de este ligando (SA/4-1BBL) como vehículo para la entrega de antígenos a las células dendríticas, mediante un sistema de complejos proteicos por la unión de SA/4-1BBL con antígenos biotinilados; sin embargo, representa un proceso laborioso debido a que es necesario emplear dos sistemas. Recientemente, con el fin de simplificar el sistema de complejos proteicos, se desarrolló una fusión génica que incluye el antígeno E7 del HPV-16, la estreptavidina y la molécula inmunoestimuladora 4-1BBL; además se demostró que dicha construcción tiene un potente efecto antitumoral y mejoría en la supervivencia al ser administrado mediante biobalística en un modelo murino de cáncer. A pesar de que estos resultados son prometedores, este tipo de sistema tiene diversas limitantes, como son la baja tasa de transfección, riesgo de integración al genoma y área de administración local, por lo que deberá ser probado en un sistema más eficiente. Los adenovirus constituyen uno de los sistemas más eficientes de entrega de genes *in vivo*, además una variante de éstos, los adenovirus oncolíticos (AdO), poseen la capacidad de replicarse selectivamente en células tumorales. Por lo que en este proyecto se pretende expresar la fusión génica SA/E7/4-1BBL en un adenovirus oncolítico, para generar una terapia génica antitumoral más eficiente.

### **Conclusiones y contribuciones:**

Se construyó un adenovirus oncolítico que porta el gen del inmunomodulador 4-1BBL fusionado al antígeno E7 (PS/SA/E7/4-1BBL).

El AdO es capaz de infectar y dirigir la expresión de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL en células tumorales y no tumorales, con envío a retículo endoplásmico.

El AdO tiene selectividad de replicación en células tumorales.



---

**Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna**

Director



## CONTENIDO TEMÁTICO

---

INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	3
INMUNOTERAPIA ADENOVIRAL EN CÁNCER .....	3
4-1BBL .....	5
RECEPTOR 4-1BB .....	7
ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS .....	8
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	14
JUSTIFICACIÓN .....	15
HIPÓTESIS .....	16
OBJETIVO GENERAL .....	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
MATERIALES .....	20
CONSTRUCCIÓN GÉNICA PS/SA/E7/4-1BBL .....	20
ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS RECOMBINANTES .....	20
LÍNEAS CELULARES .....	20
ANTICUERPOS .....	21
MEDIOS DE CULTIVO .....	21
REACTIVOS .....	22
SOLUCIONES .....	23
CONSUMIBLES .....	24
EQUIPO DE LABORATORIO .....	24

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD .....	26
METODOLOGÍA .....	27
DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL GEN PS/SA/E7/4-1BBL .....	27
CONSTRUCCIÓN DEL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO RECOMBINANTE ....	28
CULTIVO CELULAR.....	30
DETERMINACIÓN DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN (MOI) .....	30
WESTERN BLOT .....	30
INMUNOCITOFLUORESCENCIA .....	31
ENSAYO DE VIABILIDAD CON EL REACTIVO MTT .....	32
TINCIÓN CRISTAL VIOLETA.....	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
RESULTADOS.....	34
GEN PS/SA/E7/4-1BBL .....	34
CONSTRUCCIÓN DEL AdO $\Delta$ 24 PS/SA/E7/4-1BBL .....	35
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PS/SA/E7/4-1BBL .....	39
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA PS/SA/E7/4-1BBL .....	40
EFECTO ANTITUMORAL IN VITRO DEL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO ....	42
EFECTO ESPECÍFICO CONTRA CÉLULAS TUMORALES .....	43
DISCUSIÓN .....	45
CONCLUSIONES .....	48
BIBLIOGRAFÍA .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grado Celsius
4-1BB	Receptor de 4-1BB
4-1BBL	Ligando de 4-1BB
AAT	Antígeno asociado a tumor
AdO	Adenovirus Oncolítico
BSA	Albúmina de suero bovino
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
CPE	Efecto citopático
CRT	Calreticulina
E7	Antígeno E7
FBS	Suero Fetal Bovino
g	gramo
GOI	Gen de interés (del inglés "Gene Of Interest")
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
KCl	Cloruro de Potasio
kDa	Kilodalton

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotásico
L	Litro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MOI	Multiplicidad de infección
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Sodio dibásico
NaCl	Cloruro de Sodio
NBCS	Suero de becerro recién nacido (del inglés “Newborn Calf Serum”)
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PS	Péptido señal
SA	Estreptavidina
VPH	Virus del Papiloma Humano
WT	Silvestre (del inglés “Wild Type”)
μL	Microlitro

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones de E1A.	11
Figura 2. Mecanismos propuestos de efecto antitumoral.	13
Figura 3. Construcción génica PS/SA/E7/4-1BBL.	27
Figura 4. Construcción del adenovirus oncolítico recombinante.	29
Figura 5. Construcción génica PS/SA/E7/4-1BBL.	34
Figura 6. Sistema AdenoQuick 2.0.	35
Figura 7. Clonación del gen PS/SA/E7/4-1BBL en el plásmido transportador.	36
Figura 8. Ensamblaje del genoma adenoviral en un sistema de cósmido.	37
Figura 9. Linearización del genoma adenoviral y producción de partículas virales.	38
Figura 10. Detección de la expresión de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL en la línea celular HEK-293.	39
Figura 11. Localización subcelular de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL en la línea celular HEK-293.	40
Figura 12. Localización subcelular de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL en la línea celular TC-1.	41

Figura 13. Localización subcelular de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL en la línea celular NIH/3T3.	42
Figura 14. Efecto antitumoral <i>in vitro</i> del AdO $\Delta$ 24 PS/SA/E7/4-1BBL.	42
Figura 15. Evaluación de la densidad celular de TC-1 y NIH/3T3 tras la infección con los adenovirus recombinantes.	43
Figura 16. Viabilidad de las líneas NIH/3T3 y TC-1 infectadas con los adenovirus recombinantes.	44

## INTRODUCCIÓN

---

El cáncer se sitúa dentro de las primeras causas de muerte en el mundo ocasionando más de 8 millones de defunciones en el año 2015, dónde el 70% de las muertes se registran en países de nivel socioeconómico medio y bajo. El 25% de estos casos de cáncer son ocasionados por infecciones oncogénicas como las causadas por papilomavirus humanos (“WHO | World Health Organization”, s/f).

Los tratamientos actuales consisten en la cirugía, radioterapia y quimioterapia, los cuales son altamente eficientes, sin embargo, tienen la desventaja de presentar una alta tasa de recurrencia, así como efectos adversos que afectan la calidad de vida del paciente, por lo que se ha optado por explorar nuevos enfoques terapéuticos.

La terapia génica es una tecnología que utiliza secuencias de ADN modificado para la expresión óptima de diferentes proteínas, antígenos y moléculas inmunoestimulantes (Khan, 2013). La administración de esta terapia puede ser de forma directa como ADN desnudo o a través de vectores (virales y no virales).

Se han obtenido resultados muy prometedores con vacunas de ADN desnudo que codifican proteínas inmunomoduladoras como el ligando 4-1BBL en conjunto con antígenos asociados a tumor (AAT), en nuestro interés particular el antígeno

E7 del Virus del Papiloma Humano, principal agente causal del desarrollo de cáncer cervical.

Este tipo de vacunas son rápidas de producir para su evaluación preclínica además de otorgar buenos resultados. Sin embargo, presentan algunas limitaciones tales como baja tasa de transfección, vía de administración local que solo transfecta a las células adyacentes y riesgo de integración al genoma; por lo que se ha optado por ser evaluadas bajo un sistema que elimine tales limitantes.

Los adenovirus constituyen uno de los sistemas más eficientes de entrega de genes *in vivo*, esto gracias a su capacidad infectiva permitiendo que múltiples células sean transfectadas con el gen de interés. Los adenovirus oncolíticos poseen la capacidad de replicarse selectivamente en células tumorales ayudando a su eliminación, produciendo una amplificación de la respuesta que normalmente se obtenía con los adenovirus convencionales, lo que los hace muy atractivos para la terapia génica antitumoral.

Actualmente existe una gran cantidad de estudios clínicos que utilizan este tipo de vectores adenovirales, incluso algunos de ellos se encuentran aprobados para su uso terapéutico ya sea como agentes individuales o en conjunto con las terapias ya existentes.



## ANTECEDENTES

---

### **INMUNOTERAPIA ADENOVIRAL EN CÁNCER**

La inmunoterapia contra el cáncer se encarga de aprovechar las funciones de especificidad y memoria del sistema inmune en contra de células malignas para llegar a una remisión tumoral disminuyendo los efectos adversos tóxicos y reincidencias, tal como ocurre en la quimioterapia y radioterapia. Su finalidad es la generación de linfocitos T CD8+ funcionalmente activos y de larga duración los cuales sean específicos para células tumorales (Cheuk, Mufti, & Guinn, 2004; Li & Liu, 2013).

Para una respuesta celular de linfocitos CD8+ es de vital importancia la interacción de ligandos co-estimuladores presentes en las células presentadoras de antígenos con los linfocitos T CD8+. Dicha interacción permite la proliferación, diferenciación, supervivencia y homeostasis del sistema inmune. El uso de ligandos co-estimuladores ha sido implementado en el desarrollo de vacunas terapéuticas contra el cáncer (Kilinc et al., 2006; H.-W. Lee et al., 2002).

El ligando 4-1BBL ha demostrado efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmune al unirse con su receptor 4-1BB. Además, está demostrado que al usar complejos proteicos de antígenos con una forma quimérica del adyuvante 4-1BBL unido a la proteína estreptavidina (SA/4-1BBL) se incrementa la respuesta inmune antitumoral en ratones con tumores establecidos (Sharma et al., 2010).

Con el fin de simplificar el sistema de complejos proteicos se realizó una fusión génica del adyuvante SA/4-1BBL y el antígeno E7, la cual se administró como vacuna de ADN mediante biobalística, demostrando efecto antitumoral y mejoría en la supervivencia en un modelo murino de cáncer (Garza-Morales et al., 2019).

Las vacunas de ADN ofrecen varias ventajas tales como fácil producción a bajo costo y más importante aún, son capaces de despertar buenas respuestas inmunes tanto celulares como humorales (Haupt, Roggendorf, & Mann, 2002). Mientras que entre sus desventajas más importantes se presentan el riesgo de integración en el genoma, la baja tasa de transfección que solo ocurre principalmente en el área local de administración.

Por lo que, en nuestro laboratorio una vez que se ha corroborado que una vacuna ADN demuestra el efecto deseado, ésta es evaluada bajo sistemas más eficientes para su futuro escalamiento de producción.

Los adenovirus constituyen uno de los sistemas más eficientes de entrega de genes *in vivo* (C. S. Lee et al., 2017), esto debido a diversas características como la capacidad de poder incorporar grandes fragmentos de ADN en su genoma, presentan una alta eficiencia de transfección, tienen la capacidad de infectar múltiples linajes celulares, pueden ser manipulados genéticamente para evitar su patogenicidad y/o cambiar su tropismo tisular, permanecen de manera episomal dentro del núcleo y se generan altos títulos virales durante su producción.

Los adenovirus oncolíticos poseen la capacidad de replicarse selectivamente en células tumorales debido a modificaciones realizadas en sus genes tempranos, representando una estrategia eficaz y segura (Howells, Marelli, Lemoine, & Wang, 2017).

#### **4-1BBL**

El ligando 4-1BBL es una glucoproteína tipo II que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral que actúa como un inmunomodulador debido a sus efectos pleiotrópicos en la inmunidad innata, adaptativa y regulatoria. Se expresa en diversas células presentadoras de antígeno, como linfocitos B, macrófagos y células dendríticas, así como en linfocitos T activados (Li & Liu, 2013).

El gen de 4-1BBL humano se encuentra localizado en la banda p13.3 del cromosoma 19 y codifica a una glucoproteína tipo II conformada por 254 aminoácidos (Cheuk et al., 2004) que interacciona con el receptor 4-1BB, el cual se expresa en una amplia variedad de células del sistema inmune como linfocitos T, NK, NKT, Treg entre otras. Las señales mediadas por 4-1BB en los linfocitos T CD8+ dan lugar a la proliferación de éstos, la estimulación de la producción de citocinas proinflamatorias y la inhibición de la apoptosis para aumentar su supervivencia (Vinay & Kwon, 2012; Kwon & Weissman, 1989; H.-W. Lee et al., 2002).

4-1BBL existe como un homotrímero y lleva a cabo su función como una proteína ligada a la membrana. La forma soluble de este ligando carece de actividad biológica. En los estudios realizados en el año 2005 por Rabu et al. se comparó

el efecto una forma soluble del dominio extracelular de la forma humana de 4-1BBL, para lo cual éste fue combinado con un péptido de biotilación (AviTag), el cual existe como un homotrímero, o con una etiqueta monomérica FLAG, dando como resultado que 4-1BBL combinado con la AviTag posee una mayor afinidad que FLAG-4-1BBL. De igual manera, un efecto co-estimulador muy significativo fue observado en células T purificadas cuando el AviTag-4-1BBL fue inmovilizado con perlas de estreptavidina. Además, se demostró que el entrelazar dos AviTag-4-1BBL triméricos fue lo mínimo requerido para suscitar una actividad co-estimuladora significativa (Rabu et al., 2005).

Sharma *et al.* generaron una forma novedosa del ligando al fusionar el dominio extracelular del 4-1BBL murino al C-terminal de la estreptavidina (SA) modificada, dando una forma multimérica del 4-1BBL. Además, al poseer SA en su estructura permite su rápida conjugación con antígenos asociados a tumor biotilados, gracias a la potente atracción/interacción no covalente entre la estreptavidina y la biotina. Al emplear estos conjugados de antígenos con SA/4-1-BBL demostraron que se mejora la eficacia *in vivo* de captación e internalización por las células dendríticas resultando en una mejor activación del sistema inmune a través de la presentación cruzada, dando lugar una mayor proliferación y funciones efectoras (Sharma et al., 2010).

Esta estrategia ha sido de igual manera útil para contrarrestar los mecanismos de evasión de los tumores hacia el sistema inmune. Los tumores convierten células T CD4<sup>+</sup> a células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (iTreg) las cuales

juegan un papel importante en estos mecanismos de evasión. De esta manera, el bloqueo de esta conversión de células T CD4+ a células iTreg representa una diana para mejorar la eficacia de terapias inmunoterapéuticas. En el año 2012, Madireddi et al. demostraron que la co-estimulación de SA/4-1BBL inhibe la conversión de células T CD4+ convencionales a células iTreg mediante la producción de IFN- $\gamma$  (Madireddi et al., 2012).

### **RECEPTOR 4-1BB**

4-1BB (CD137) es un miembro de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) la cual es expresada de manera inducible en altos niveles principalmente en las membranas de los linfocitos T CD4+ y CD8+ activadas siendo su principal efecto el inmunoestimular a dichas células y convirtiéndose así en un blanco prometedor para su estudio en la inmunomodulación (Zhou et al., 1995). Fue caracterizado por primera vez en ratones, y posteriormente el homólogo humano de 4-1BB fue caracterizado por Alderson, et al. en 1994.

El gen de este receptor 4-1BB se localiza en el locus 1p36, el cual codifica para una proteína de 255 aminoácidos y los análisis de hidrofobicidad predicen que los residuos 1 al 17 comprenden un péptido señal el cual es seguido por un dominio extracelular de 169 residuos, una región transmembranal de 27 residuos y finalmente un dominio extracelular de 42 residuos (Cheuk et al., 2004). Es sobre expresado cuando células T son activadas por algún agonista en la presencia de células presentadoras de antígenos. Se expresa en células T CD4+, CD8+, NK, NKT y de manera constitutiva en células dendríticas CD11c+ y células T

reguladoras (Treg) CD4+ CD25+. También se ha observado expresión funcional en células de la serie mieloide como monocitos, eosinófilos, neutrófilos y células cebadas (Vinay & Kwon, 2012).

Cuando el 4-1BB se une a su ligando de alta afinidad 4-1BBL, el cual se expresa en una variedad de células presentadoras de antígenos como células dendríticas, células B y macrófagos, induce activación de células T, expansión clonal, supervivencia y el establecimiento de una memoria inmune a largo plazo (Helmy, Patel, Nahas, & Rameshwar, 2013; H.-W. Lee et al., 2002; Vinay & Kwon, 2012).

## **ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS**

Los adenovirus son virus no envueltos por membrana, presentan una cápside proteica icosaédrica que engloba un ADN linear de doble cadena de aproximadamente 36,000 pares de bases. El genoma codifica aproximadamente 35 proteínas que son clasificadas como: “early” o “tempranas” para las proteínas expresadas antes de la iniciación de la replicación viral, y “late” para aquellas tras la iniciación de la replicación del ADN (C. S. Lee et al., 2017).

Las proteínas tempranas tienen funciones regulatorias que permiten al virus tomar control de la célula para llevar a cabo la replicación del ADN viral, mientras que las proteínas tardías son aquellas que cumplen funciones estructurales para la formación de las cápsides de los nuevos viriones formados. Los viriones son ensamblados en el núcleo alrededor del primer día postinfección y después de varios días, la célula es lisada liberando alrededor de 10,000 viriones, esto bajo un sistema de amplificación en células permisivas. Existen al menos 57 serotipos

de adenovirus humanos, que forman 7 especies que van de la A-G (Wold & Toth, 2013).

La infección en humanos suele ser asintomática o puede desarrollar una enfermedad leve en tracto respiratorio, digestivo o urinario, que puede ser resuelta en sujetos inmunocompetentes. En la mayoría de la población existe inmunidad para los serotipos más frecuentes, por lo que las investigaciones en terapia génica se han enfocado en usar los serotipos menos frecuentes 2 y 5.

Los adenovirus, como vectores virales, ofrecen diferentes ventajas, comparados con otros sistemas de entrega de genes. Primeramente, constituyen el sistema más eficiente de entrega de genes *in vivo*; y esto debido a diversas características, tales como alta capacidad de infección, alta expresión del transgén, residencia episomal en el núcleo, por lo que no se integran al genoma, son capaces de infectar células que se estén dividiendo y no, son inmunogénicos por sí mismos, además regularmente se obtienen altos títulos virales (C. S. Lee et al., 2017). Debido a su alta inmunogenicidad, son ideales candidatos para su aplicación en oncolísis y vacunación.

A lo largo de los años, se han desarrollado diferentes tipos de vectores adenovirales, existen dos tipos: los de replicación deficiente y los de replicación competente (oncolíticos).

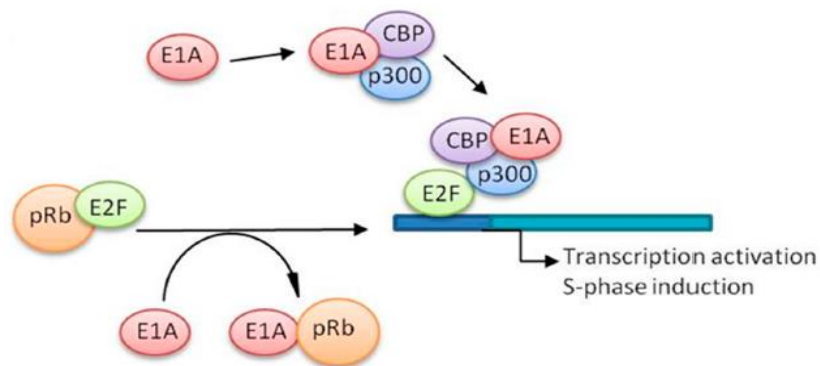
El uso de los adenovirus inició con los de primera generación, que para establecer su uso seguro se eliminaron genes esenciales de la replicación viral (E1a y E1b), la depleción de dichos genes resultó en adenovirus de replicación deficiente, los cuales tienen una capacidad de clonación de transgén reducida. Son generados utilizando recombinación homóloga en células que expresan el gen E1, tales como las HEK-293. En la actualidad son raramente utilizados, ya que su generación es un proceso extremadamente ineficiente. Inicialmente fueron utilizados por sus propiedades inmunogénicas para la entrega de genes directamente a las células tumorales induciendo una respuesta inmune antitumoral local (C. S. Lee et al., 2017).

Los adenovirus de replicación competente son ampliamente utilizados en terapia génica para el cáncer, éstos son diseñados para replicarse preferencialmente en células tumorales y destruirlas a través del proceso lítico natural de la replicación viral (Wold & Toth, 2013). Algunas de las estrategias oncolíticas más significantes, están basadas en mutaciones de los genes tempranos para habilitar la replicación selectiva en células tumorales, mientras que las células no transformadas se conservan (Baker, Aguirre-Hernández, Halldén, & Parker, 2018). La estrategia más común para generar adenovirus oncolíticos es la delección de genes que son esenciales para la replicación viral en células normales, pero que es compensada en células tumorales con el ciclo celular alterado, daño en la reparación del ADN y mecanismos de muerte celular (Bressy & Benihoud, 2014).



El primer adenovirus oncolítico para estudios clínicos fue generado por delección de la proteína E1B55K. Durante las etapas tempranas de la infección viral, E1BBK se une a p53 y promueve la transición G1/S en presencia de ADN viral y ADN dañado de la célula hospedera. E1BBK es vital para la replicación del adenovirus en células normales, mientras que, en la mayoría de los tipos de cáncer, p53 no es funcional, resultado de mutaciones directas o indirectas en las proteínas reguladoras de p53 (White, 2006). A pesar de demostrar su seguridad, estos adenovirus presentaron una pobre replicación en células tumorales, con resultados modestos en los ensayos clínicos.

Debido a la atenuada replicación con los E1B55K mutantes, surgió una nueva generación de adenovirus con pequeñas delecciones específicas en el gen E1A, para retener la potencia viral, mientras todavía sigue siendo tumor-selectivo. La expresión de E1A es absolutamente requerida para la replicación viral, a través de la unión de la proteína de retinoblastoma pRb, que libera a E2F para inducir una fase de síntesis, habilitando al virus para explotar el ADN celular y los mecanismos de síntesis de proteínas (Berk, 2005).

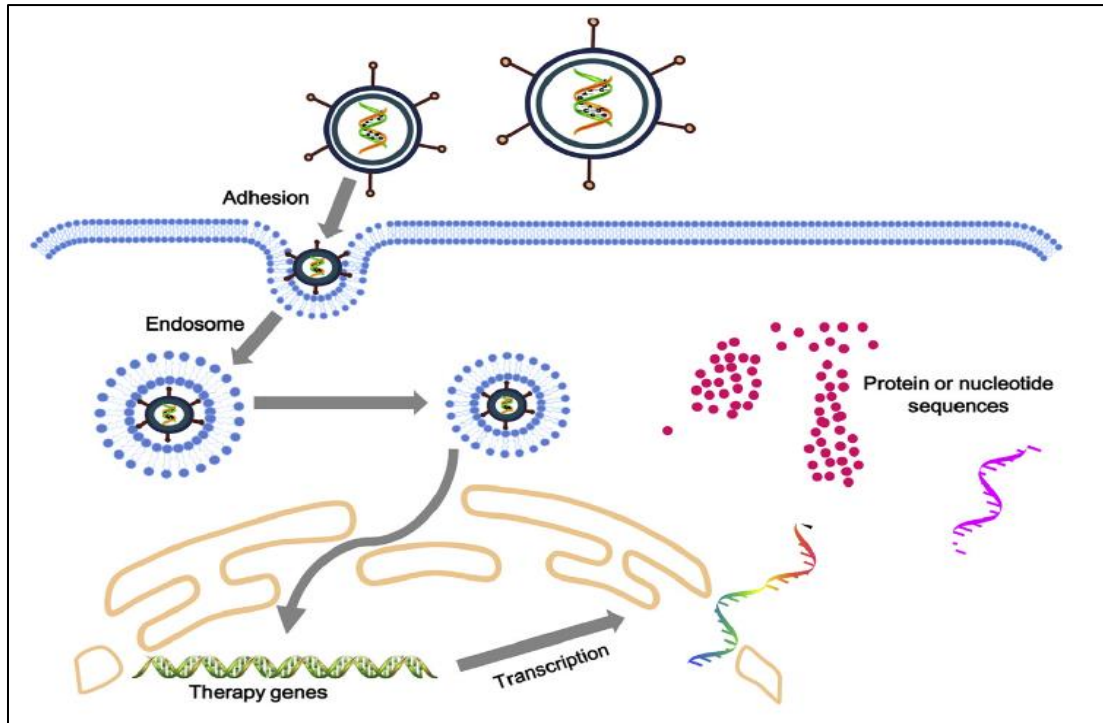


**Figura 1. Funciones de E1A.** La expresión de E1A es absolutamente requerida para la replicación viral, al unirse a la proteína Rb libera al factor de transcripción E2F, el cual actúa directamente en la replicación del genoma viral, así como inducción de la fase de síntesis en el ciclo celular.

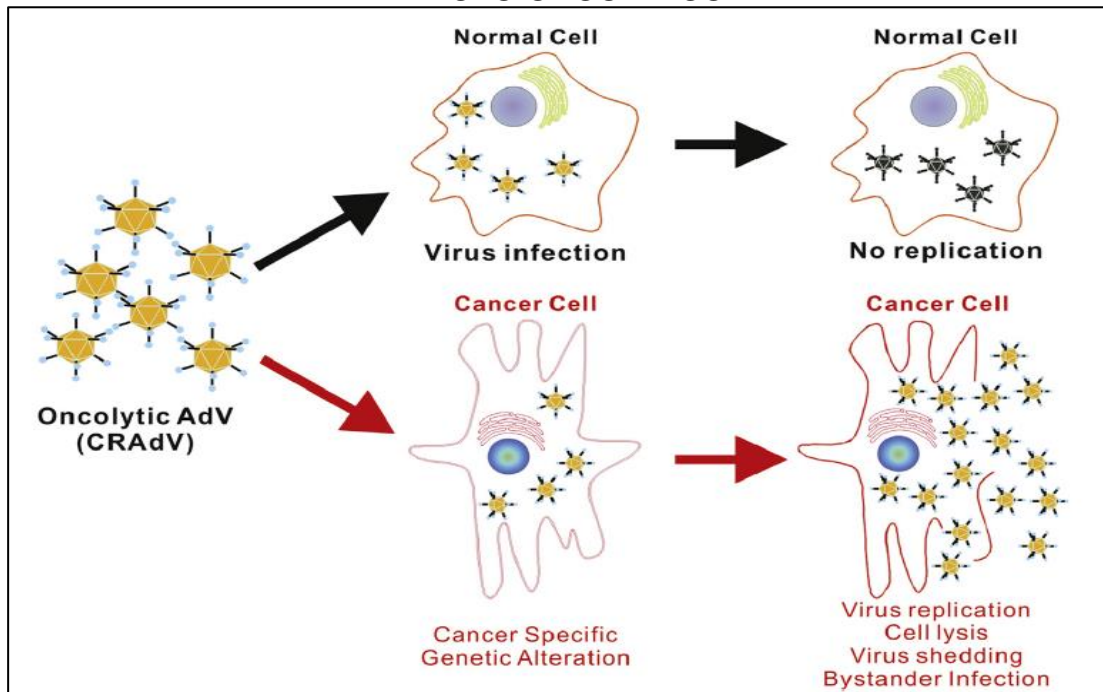
El gen E1A contiene cuatro regiones conservadas (CR1, CR2, CR3 y CR4), cada una con sus funciones específicas. El factor de transcripción celular E2F es normalmente reprimido por la proteína de retinoblastoma (pRB) o por miembros de esta familia p130 o p107. Cuando el pequeño dominio (24 aminoácidos) E1ACR2, se une a pRB, E2F es liberado e induce la fase de síntesis. La delección en E1ACR2, permite la replicación selectiva en células tumorales con alteraciones en la regulación del ciclo celular, pero no en células normales con un control intacto del crecimiento. Los primeros adenovirus con esta mutación fueron dl922-947 y Ad $\Delta$ 24 (Fueyo et al., 2000; Heise et al., 2000).

En el presente trabajo se buscó obtener un efecto antitumoral mediante la combinación de dos mecanismos, por un lado, la expresión del transgén que previamente ha demostrado un efecto antitumoral, y por otro lado el efecto de lisis específica sobre células tumorales de los adenovirus oncolíticos.

## EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN



## EFEECTO ONCOLÍTICO



**Figura 2. Mecanismos propuestos de efecto antitumoral.** Se propone la combinación de la expresión de un transgén con efecto antitumoral ya demostrado y el uso de un adenovirus oncolítico como mecanismo para lograr un efecto antitumoral (tomado de Genes & Diseases (2017) 4,43-63).

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

---

¿Será posible expresar la fusión génica PS/SA/E7/4-1BBL en el contexto de una terapia génica adenoviral?

## JUSTIFICACIÓN

---

Está demostrado que el ligando 4-1BBL al unirse con su receptor 4-1BB, ocasiona efectos pleiotrópicos en células del sistema inmune innato, adaptativo y regulatorio. Recientemente se demostró que al conjugar una forma quimérica del ligando (SA/4-1BBL) con el antígeno E7, en forma de complejos proteicos, confiere mayor efecto antitumoral, así como mayor supervivencia en modelos murinos de cáncer.

La fusión del adyuvante SA/4-1BBL y el antígeno E7 en un solo gen, administrada mediante biobalística demostró los mismos efectos encontrados en el sistema de complejos proteicos.

Debido a que los adenovirus constituyen el sistema más eficiente de entrega de genes *in vivo*, y ya que los adenovirus oncolíticos son capaces de replicarse en células tumorales, en este trabajo se propone expresar la fusión génica PS/SA/E7/4-1BBL en el contexto de un adenovirus oncolítico.

## **HIPÓTESIS**

---

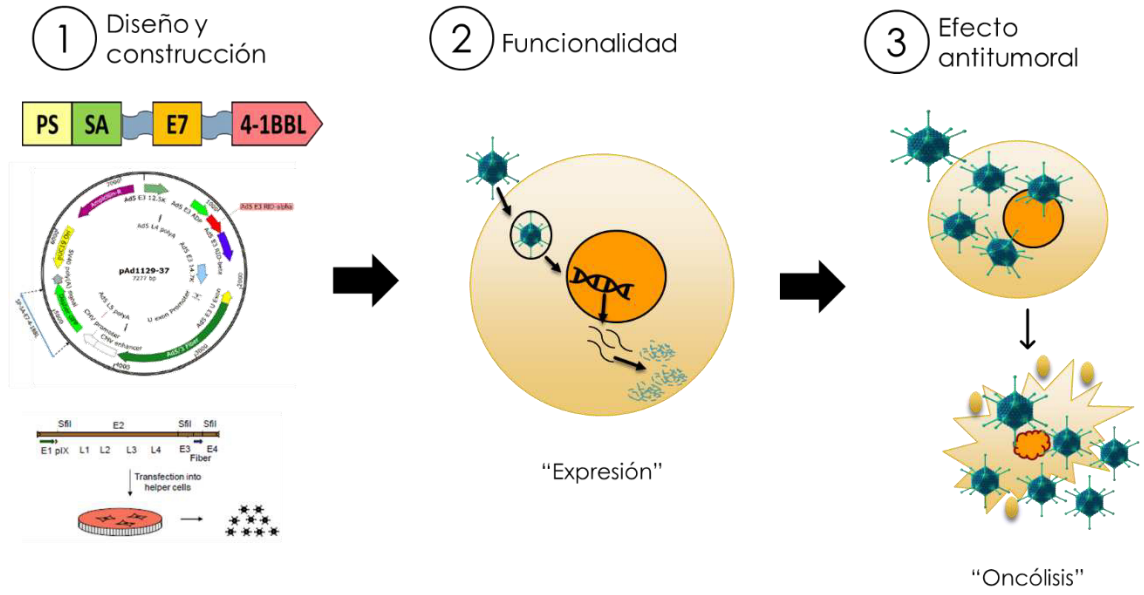
El sistema adyuvante 4-1BBL fusionado al antígeno E7 funciona en el contexto de una terapia génica adenoviral.

## **OBJETIVO GENERAL**

---

Demostrar si el sistema adyuvante 4-1BBL fusionado al antígeno E7, funciona en el contexto de una terapia génica adenoviral.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

1. Construir un adenovirus oncolítico que exprese el sistema adyuvante 4-1BBL fusionado al antígeno E7.
2. Demostrar la funcionalidad del adenovirus oncolítico recombinante.
3. Determinar si el adenovirus oncolítico recombinante posee un efecto antitumoral *in vitro*.

## MATERIALES

---

### **CONSTRUCCIÓN GÉNICA PS/SA/E7/4-1BBL**

Partiendo del extremo amino hacia el extremo carboxilo, la secuencia está conformada por un péptido señal, el núcleo de la estreptavidina, el antígeno E7 del VPH-16, en el extremo carboxilo el dominio extracelular del 4-1BBL; y como espaciadores entre cada una de subunidades se encuentran dos linkers (Gly4Ser)<sub>3</sub>; y la secuencia completa se encuentra flanqueada por los sitios de restricción *Bgl*II y *Hind*III.

### **ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS RECOMBINANTES**

El genoma adenoviral a utilizar presenta una delección delta 24 en el gen E1, una delección *Bgl*II-*Mfe*I de 1222 bp de longitud en la región E3 conservando los genes E3 ADP, RID $\alpha$ , RID $\beta$  y 14.7K, una fibra híbrida Ad5/3 y un casete de expresión CMV-(SP)-SA-E7-4-1BBL-SV40-pA insertado entre el gen de la fibra y la región E4.

### **LÍNEAS CELULARES**

HEK-293: Células embrionarias de riñón humano 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).

NIH/3T3: Fibroblastos embrionarios de ratón (CRL-1658, ATCC).

## **ANTICUERPOS**

Anticuerpo monoclonal murino Anti-E7 (NM2: sc-65711, Santa Cruz Biotechnology)

Anticuerpo monoclonal de rata Anti-4-1BBL (RM0067-3H19: ab86575)

Anticuerpo policlonal de conejo Anti-calnexina (H-70: sc-11397, Santa Cruz Biotechnology, descontinuado)

Anticuerpo policlonal de conejo Anti-IgG de ratón conjugado con HRP (A9044, Sigma Aldrich)

Anticuerpo policlonal de cabra Anti-IgG de conejo conjugado con CF488A (20019, Biotium)

Anticuerpo policlonal de cabra Anti-IgG de ratón conjugado con CF594 (20111, Biotium)

Anticuerpo policlonal de cabra Anti-IgG de rata conjugada con FITC (31629, Thermo Fisher)

## **MEDIOS DE CULTIVO**

Medio DMEM “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (11995-065, gibco)

Medio RPMI 1640 “Roswell Park Memorial Institute” (R8758, Sigma-Aldrich)

Glutamina: GlutaMAX (35050-061, Gibco)

Piruvato (11360070, Gibco)

Antibiótico-Antimicótico: Penicilina-Streptomina (11360070, Gibco)

G-418: Geneticina (11811023, Thermo Fisher Scientific)

Mercaptoetanol (21985023, Gibco)

Ficoll-Paque (GE17-1440-02, Sigma-Aldrich)

## **REACTIVOS**

4',6-Diamidino-2-Fenilindol DAPI (D1306, Thermo Fisher Scientific)

Acrilamida/Bis-Acrilamida 30% (A3699, Sigma-Aldrich)

Agua bidestilada (Laboratorios Monterrey)

Antibiótico-antimicótico: Penicilina-Estreptomicina (30-004-CI, Corning)

Azul de tripano (15250061, Gibco)

Bromuro de tiazolil azul tetrazolio MTT (M2128, Sigma-Aldrich)

BSA (B90015, NEB)

Buffer de carga para proteínas 4X (Gibco)

Cloruro de Sodio, NaCl (746398, Sigma-Aldrich)

Cristal violeta (C3886-25G, Sigma-Aldrich)

Ditiotreitol, DTT (3483-12-3, Sigma-Aldrich)

DMSO "Dimetilsulfóxido" (D8418, Sigma-Aldrich)

Dodecilsulfato sódico, SDS (9602L, Probiotek)

Etanol (CTR)

Isopropanol (9095, JT. Baker)

Leche descremada (Svelty)

Metanol 100% (M6125, JalmeK)

Persulfato de amonio (A3678, Sigma-Aldrich)

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)

Tween-20 (91379, Sigma-Aldrich)

## **SOLUCIONES**

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 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

Ditiotreitol (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

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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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

## **CONSUMIBLES**

Cajas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> y 25 cm<sup>2</sup> (Corning)

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)

Pipetas serológicas 10 mL y 5 mL (Corning)

Pipetor para cultivo celular (Labnet)

Placas de 6, 12, 24 y 96 pozos (Corning)

Platos de 100 y 150 mm (Corning y Celltreat Scientific Products)

Puntillas "MultiGuard Barrier Tips" (Sorenson, BioScience, Inc)

Tubos eppendorf de 1.7 mL y 600 µL (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 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)

Fuente de poder (300 Plus, Labnet)

Incubadora de CO<sub>2</sub> para cultivo celular (370, ThermoElectronCorporation)

Incubadora refrigerada (LM-570, MRC)

Lector de placas ELISA (iMARK, Bio-Rad)

Micropipetas 1000 µL, 200 µL, 20 µL, 10 µL (Labnet)

Microscopio invertido (9804439, Southern Precision Instrument)

Refrigerador 4°C/ -20°C (RS25J5008SP, Samsung)

Software para gráficas y análisis estadísticos (GrapPadPrism 6)

Ultracongelador -80°C (RevcoValue Plus, Thermo Fisher Scientific)

Vernier digital (Truper)

Vórtex (Genie 2, Daigger & CO, Inc.)

## **MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD**

Debido al uso de adenovirus recombinantes, el presente estudio pertenece al Grupo de Riesgo 2 de acuerdo con el Manual de Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos 5ª Edición 2007, CDC/NIH. Por lo tanto, se usó una campana de bioseguridad nivel 2.

Como medida de prevención se descontaminó diariamente el área de trabajo, se usó equipo de protección personal como bata, cubrebocas, guantes de nitrilo, lentes de seguridad y calzado cerrado. Además, se utilizaron puntillas con filtro al manipular los adenovirus, así como descontaminación de los residuos generados con hipoclorito de sodio al 4% previo a su desecho.

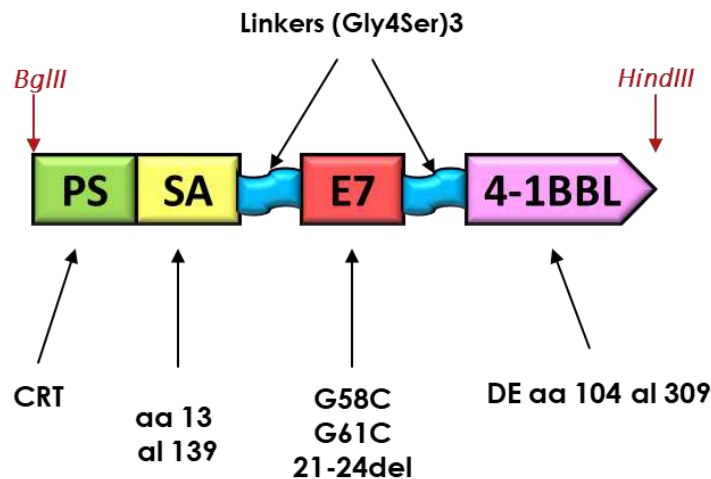
En cuanto al manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos primeramente se separaron en objetos punzocortantes, residuos no anatómicos, anatómicos y utensilios desechables; el envasado se realizó de acuerdo con el tipo de residuos, el almacenamiento temporal fue en el área designada y debidamente señalizada en nuestro laboratorio, posteriormente fueron recolectados para su disposición final. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos fueron manejados con respecto a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.



## METODOLOGÍA

### DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL GEN PS/SA/E7/4-1BBL

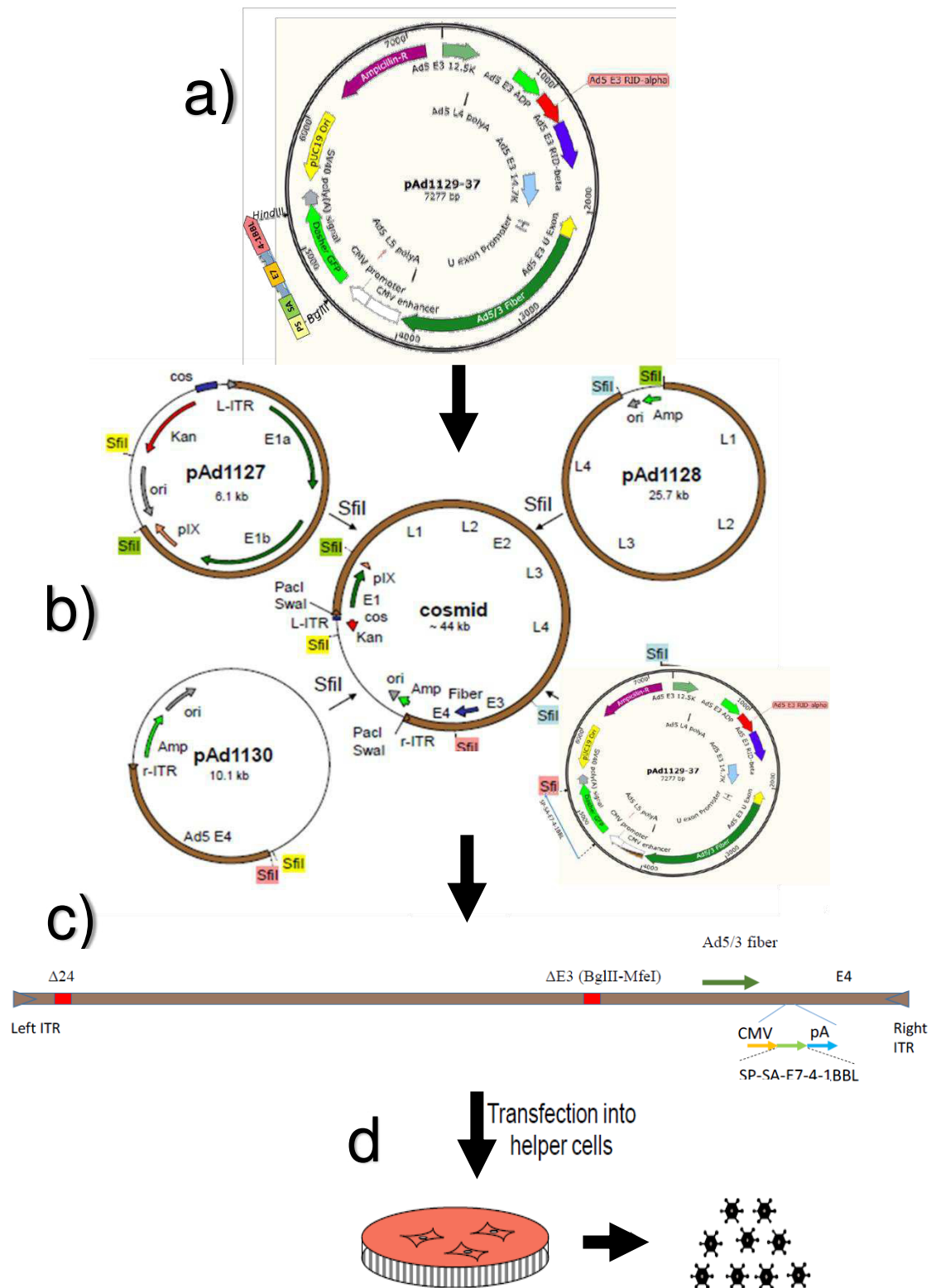
Primeramente, se diseñó y se mandó a sintetizar un gen que contiene las secuencias codificantes para el péptido señal de la CRT para que la proteína sea enviada a la vía secretora; seguida por el núcleo de la estreptavidina que va del aminoácido 13 al 139, el antígeno E7 del VPH-16 con las sustituciones en las glicinas 58 y 61 por cisteína y deleciones de los aminoácidos 21-24, esto para eliminar el riesgo oncogénico, y finalmente el dominio extracelular del 4-1BBL que corresponde a los aminoácidos 104 al 309 responsables del entrecruzamiento con el receptor 4-1BB. Entre los genes se colocaron los Linkers de (Gly4Ser)<sub>3</sub> para permitir el plegamiento estructural, su funcionalidad y estabilidad de cada fracción que conforma la proteína resultante (Figura 3).



**Figura 3. Construcción génica PS/SA/E7/4-1BBL.** Se muestran las subunidades que conforman la construcción génica evaluada.

## **CONSTRUCCIÓN DEL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO RECOMBINANTE**

Posteriormente se mandó a sintetizar el genoma adenoviral con nuestro gen de interés (GOI). El genoma adenoviral está caracterizado por una región E1 WT, una deleción *BglII-MfeI* de 1222 bp de longitud en la región E3, en el que se conservan los genes E3 ADP, RID $\alpha$ , RID $\beta$  y 14.7K, una fibra híbrida Ad5 / 3 y un casete de expresión CMV-(SP) -SA-E7-4-1BBL-SV40-pA insertado entre el gen de la fibra y la región E4. Esto se realizó mediante un sistema modular que utiliza 4 plásmidos pequeños, los cuales codifican los diferentes genes del adenovirus, así como el GOI; a través de una ligación direccional se constituyó el genoma completo que posteriormente se empaquetó en cápsides de bacteriófago lambda para su propagación en *Escherichia coli*, y así obtener múltiples copias del genoma adenoviral. Este genoma adenoviral fue linearizado con enzimas de restricción (*PacI*) y se utilizó para transfectar la línea celular HEK-293 y generar así las partículas virales que fueron utilizadas en los ensayos posteriores.



**Figura 4. Construcción del adenovirus oncolítico recombinante.** a) Transferencia del gen de interés al plásmido transportador, b) Constitución del genoma adenoviral a partir de cuatro plásmidos pequeños, c) Linearización del genoma adenoviral, d) Transfección de células HEK-293 con el genoma linearizado para la obtención de las partículas virales.

## **CULTIVO CELULAR**

La línea celular HEK-293 se cultivó en medio DMEM suplementado con FBS 10%, glutamina 2 mM, piruvato 1X, antibiótico-antimicótico. Las células TC-1 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con FBS 5%, piruvato 1X, antibiótico-antimicótico y G418 200 ng/ml. Las células NIH/3T3 se cultivaron en medio DMEM suplementado con NBCS 10%, glutamina 2 mM, antibiótico-antimicótico. Las líneas celulares fueron incubadas a 37°C bajo una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

## **DETERMINACIÓN DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN (MOI)**

Este ensayo se realizó para conocer el número aproximado de partículas virales presentes en los extractos crudos. En una placa de 6 pozos con 1x10<sup>6</sup> células HEK- 293 por pozo se removió el medio de cultivo y se agregaron 500 µL de medio fresco, posteriormente se agregaron 25, 50, 100, 150 y 200 µL del extracto crudo a probar, dejando un pozo como control sin infección, y se incubó durante 3 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>; posteriormente se agregó 1.5 mL de medio DMEM a cada pozo y se incubó por 72 horas. Se observó el efecto citopático producido (CPE), donde el mínimo volumen que produjo un CPE total corresponde a un MOI de 10 a 20.

## **WESTERN BLOT**

Se colectaron las células del ensayo de MOI y se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C, se lavaron con PBS 1X y se lisaron con 100 µL de buffer de lisis en hielo por 20 minutos, el lisado se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C, se colectó el sobrenadante y se cuantificaron

las proteínas por el método de Bradford, utilizando BSA para la curva de estándares. Se desnaturalizaron las proteínas por 10 minutos a 100°C. Se cargaron 30 µg de proteína por carril en un gel de poliacrilamida 10% y se corrió la electroforesis SDS-PAGE a 80 V. Se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa a 120 A por 1 hora, se bloqueó la membrana con leche descremada al 10% durante 1 hora en agitación a 4°C, se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario anti-E7 (NM2) en una dilución de 1:3000 a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con TBST en agitación a 4°C por 15 minutos, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con HRP en una dilución 1:5000 a 4°C en agitación por 2 horas. Se lavó la membrana nuevamente 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**

En una caja de 24 pozos se colocaron cubreobjetos a 8 pozos, posteriormente se sembraron  $5 \times 10^5$  células (HEK-293, TC-1 o NIH/3T3) por pozo con 1 mL de medio correspondiente y se incubaron toda la noche a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Al siguiente día se infectaron con los adenovirus correspondientes a un MOI de 40. A las 15 horas post-infección se retiró el medio, se lavaron las células, se fijaron-permeabilizaron con 200 µL de metanol por 10 minutos a -20°C y 200 µL de acetona por 1 minuto, se retiró el fijador y se lavaron con PBS 1X frío. Se realizó el bloqueo con 1 mL de suero de caballo al 3% por 1 hora a 4°C, se retiró el suero y se incubó toda la noche con los anticuerpos primarios anti-E7 (NM2), anti-

calnexina (H-70), anti-4-1BBL (RM0067-3H19) a una dilución 1:500. Al siguiente día se retiraron los anticuerpos primarios y se hicieron 3 lavados con PBS 1x. Se agregaron los anticuerpos secundarios anti-mouse CF594, anti-conejo CF488A y anti-rata FITC, incubando por 2 horas a 4°C. Finalmente se tiñó con DAPI y se realizó montaje con glicerol. Las laminillas fueron analizadas bajo microscopio de Fluorescencia y procesadas por el software QCapture Pro.

### **ENSAYO DE VIABILIDAD CON EL REACTIVO MTT**

En una placa de 96 pozos se sembraron ( $5 \times 10^4$  células TC-1 y NIH/3T3) por pozo con 300  $\mu$ l de medio, se infectaron con los adenovirus correspondientes a una MOI de 0, 100, 500, 1000, 2500 y 5000 por triplicado, se dejaron incubando 72 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Al cumplir las 72 horas postinfección, se añadieron 30  $\mu$ L de reactivo MTT a cada pocillo y se dejó incubando hasta observar formación de precipitado, posteriormente se retiraron 290  $\mu$ L del reactivo y se agregaron 100  $\mu$ L de DMSO. Finalmente se leyó la absorbancia a 595 nm en el lector de placas iMark (Biorad).

### **TINCIÓN CRISTAL VIOLETA**

En una placa de 24 pozos se sembraron ( $5 \times 10^4$  células TC-1) por pozo con 1 mL de medio, se infectaron con los adenovirus correspondientes a un MOI de 0, 100, 500, 1000, 2500 y 5000 por triplicado, se dejaron incubando 72 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Al cumplir las 72 horas se retiró el medio, se agregaron 200  $\mu$ L de cristal violeta 1%-metanol a cada pocillo y se dejó incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el colorante y se hicieron cuatro lavados con agua bidestilada, se retiró la solución de lavado y se dejó secar la placa

completamente. Posteriormente se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de metanol y se dejó incubando por 20 minutos a temperatura ambiente, agitando ocasionalmente. Finalmente se leyó la absorbancia a 595 nm en el lector de placas iMark (Biorad).

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos fueron analizados y graficados con el programa GraphPad Prism 8 utilizando ANOVA de 2 factores. Los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados como significativos.

## RESULTADOS

### GEN PS/SA/E7/4-1BBL

Secuencia codificante del gen PS/SA/E7/4-1BBL, partiendo del extremo amino hacia el extremo carboxilo, la secuencia está conformada por un péptido señal, el núcleo de la estreptavidina, el antígeno E7 del VPH-16, en el extremo carboxilo el dominio extracelular del 4-1BBL; y como espaciadores entre cada una de subunidades se encuentran dos linkers (Gly4Ser)<sub>3</sub>; y la secuencia completa se encuentra flanqueada por los sitios de restricción *Bgl*II y *Hind*III.

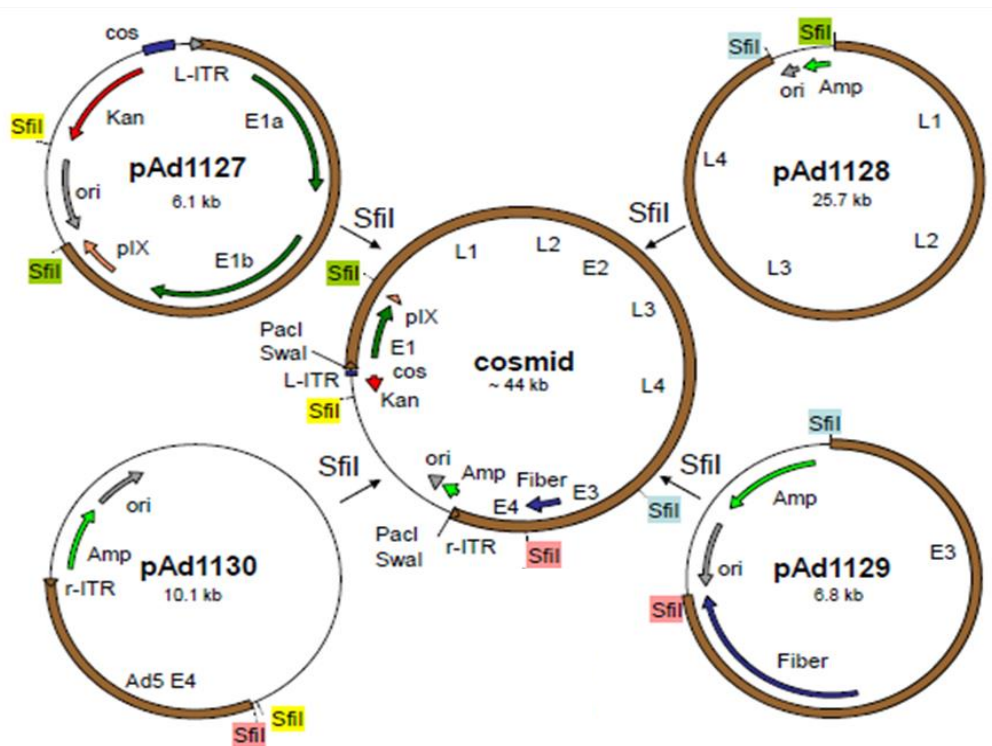
<p><u>AGATCT</u>GCCGCCACCATGCTTCTGTCAGTACCACTGCTTCTGGGCTATTGGGATTGGCTGTGGCTATCACCGGC  ACCTGGTACAACCAGCTCGGCTCGACCTTCATCGTGACCGCGGGCGCCGATGGCGCCCTGACCGGAACCTACG  AGTCGGCCGTCGGCAACGCCGAGAGCCGCTACGTCTTGACCGGTCGTTACGACAGCGCCCGGCCACCGACG  GCAGCGGCACCGCCCTCGGTTGGACGGTGGCCTGGAAGAATAACTACCGAACGCCCACTCCGCGACCACGT  GGAGCGGCCAGTACGTGCGCGCGCCGAGGCGAGGATCAACACCCAGTGCTATTGACCTCCGGCGCCACC  GAGGCCAACGCCTGGAAGTCCACGCTGGTGGCCACGACACCTTCACCAAGGTGAAGCCGTCGCCGCTCA  AGC<u>GTCGAC</u>GCTGAAGCTGCAGCTAAAGAAGCTGCAGCTAAAGCTGCTGCTATGCATGGAGATACACCTACAT  TGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAG  AGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCAGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTT  TTGTTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTGTAACCTTGGAAAGACC  TGTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTCGCCCATCTGTTCTCAGAAACCA<u>GTCGAC</u>GCTGAAGCTGCAGCTAAA  GAAGCTGCAGCTAAAGCTGCTGCTCGCACCCAGCCTCGGCCAGCGCTCACAATCACCACCTCGCCAACTGG  GTACCCGAGAGAATAATGCAGACCAGGTCACCCCTGTTCCACATTGGCTGCCCAACTACACAACAGGG  CTCTCCTGTGTTCCGAAGCTACTGGCTAAAAACCAAGCATCGTTGTGCAATACTGAACTGGCACAGCC  AAGATGGAGCTGGGAGCTCATACCTATCTCAAGGCTGAGGTACGAAGAAGACAAAAAGGAGTTGGTGGTAG  ACAGTCCCGGGCTCTACTACGTATTTTGGAACTGAAGCTCAGTCCAACATTACAAAACAGGCCACAAGGT  GCAGGGCTGGGTCTCTCTGTTTGAAGCAAAAGCCTCAGGTAGATGACTTTGACAACCTGGCCCTGACAGTG  GAACTGTTCCCTGCTCCATGGAGAACAAGTTAGTGACCGTTCCTGGAGTCAACTGTTGCTCCTGAAGGCTG  GCCACCGCTCAGTGTGGTCTGAGGGCTTATCTGCATGGAGCCAGGATGCATACAGAGACTGGGAGCTGTC  TTATCCCAACACCACCAGCTTTGACTCTTCTGTGAAACCCGACAACCCATGGGAATGA<u>AAGCTT</u></p>	<p><b>PS</b></p> <p><b>SA</b></p> <p><b>E7</b></p> <p><b>LINKERS</b></p> <p><b>41BBL</b></p> <p><b><u>Bgl</u>II</b></p> <p><b><u>Hind</u>III</b></p>
--	--

**Figura 5. Construcción génica PS-SA-E7-41BBL.** Se muestra la secuencia codificante de las subunidades que conforman la construcción génica evaluada, así como los sitios de restricción *Bgl*II (AGATCT), *Nhe*I (GTCGAC) y *Hind*III (AAGCTT).



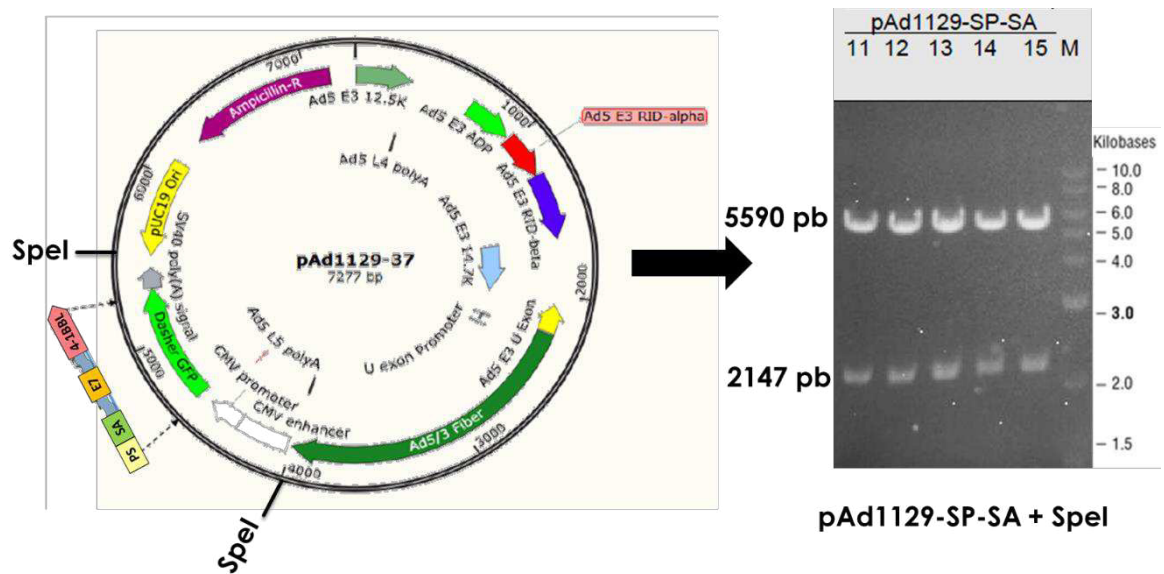
## CONSTRUCCIÓN DEL AdO Δ24 PS/SA/E7/4-1BBL

El genoma adenoviral con nuestro gen de interés fue constituido en un cósmido a partir de cuatro plásmidos pequeños, utilizando el sitio de restricción *SfiI* (GGCCNNNN/NGGCC), el cual es un palíndromo interrumpido que reconoce sitios diferentes en los cuatro plásmidos, para posteriormente realizar una ligación direccional.



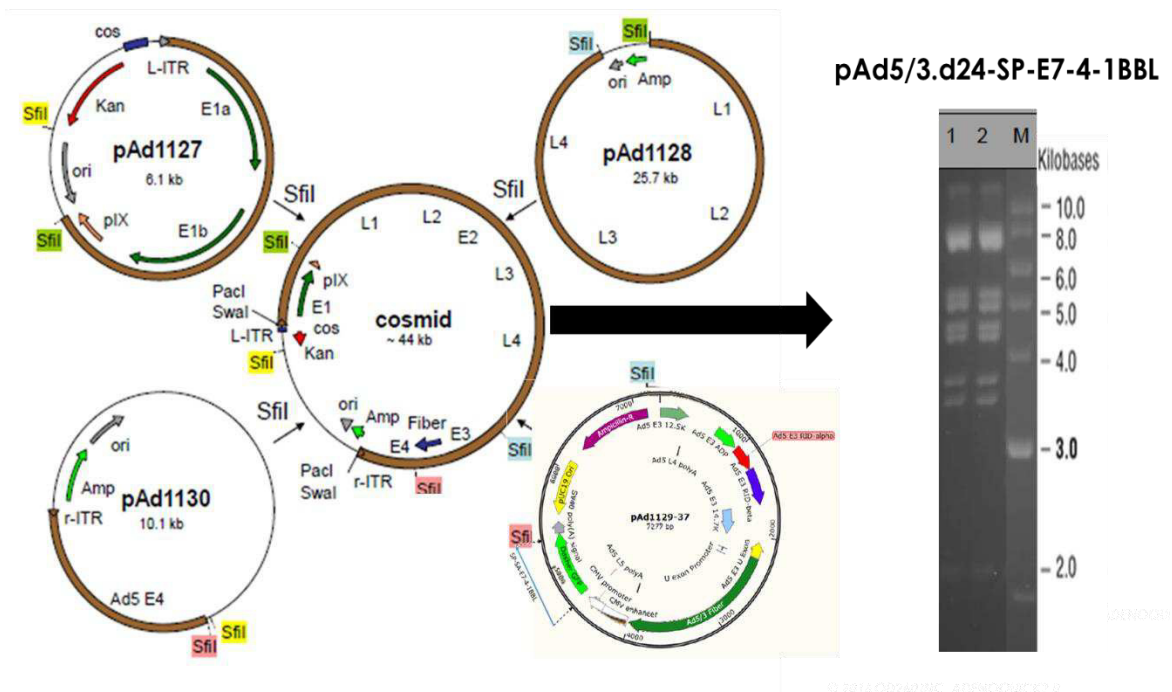
**Figura 6. Sistema AdenoQuick 2.0.** Sistema modular que constituye el genoma adenoviral en un cósmido a partir de los 4 plásmidos pAd1127, pAd1128, pAd1129 y pAd1130.

El primer paso fue clonar nuestro gen de interés en el pAd1129, una vez clonado se purificó el ADN plasmídico y fue digerido con la enzima *SpeI*, para la cual existen 2 sitios de restricción en dicho plásmido, obteniendo una banda de 5590 pb correspondiente al esqueleto del plásmido y una de 2147 pb que corresponde al fragmento clonado, con lo cual se verificó la correcta clonación del gen.



**Figura 7. Clonación del gen PS/SA/E7/4-1BBL en el plásmido transportador.** Se muestra el mapa del pAd1129 con los sitios de restricción *SpeI* y el sitio de clonación del gen de interés; a la derecha gel de agarosa de la digestión con la enzima *SpeI* que muestra una banda de 5590 pb y una de 2147 pb.

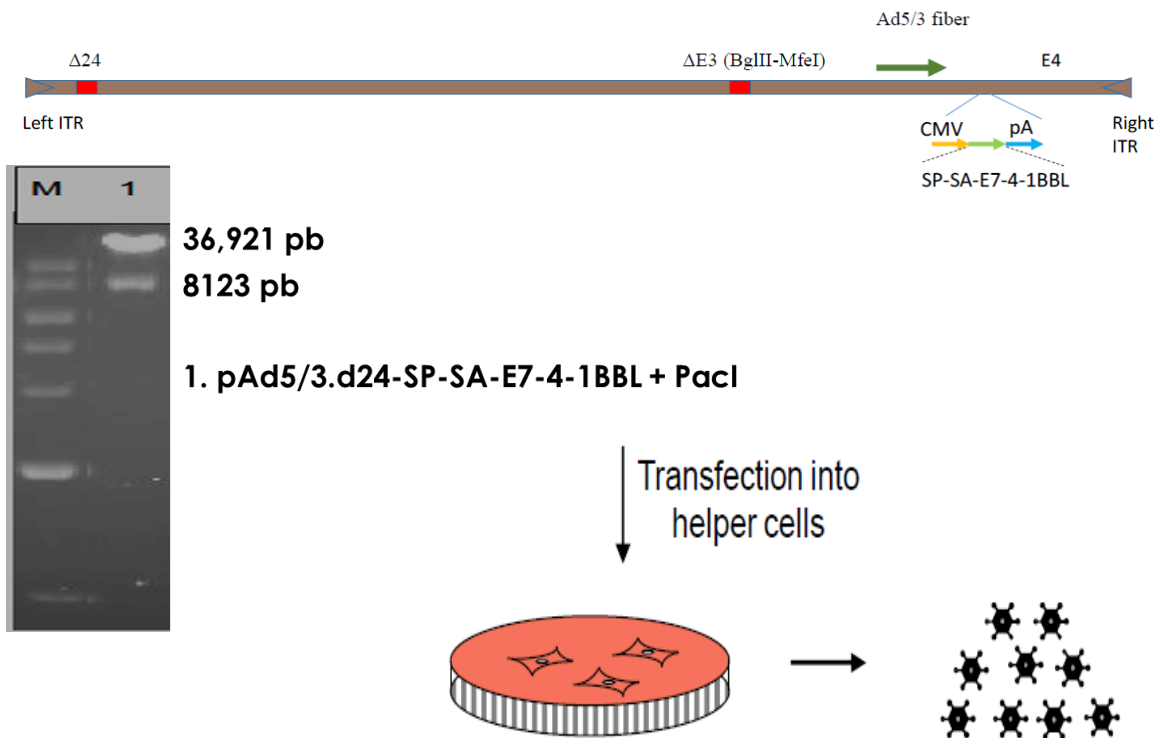
Una vez clonado el gen de interés en el pAd1129 se ensambló el genoma adenoviral en un cósmido que posteriormente se empaquetó en cápsides de bacteriófago lambda para su propagación en *Escherichia coli*, obteniendo así múltiples copias del genoma adenoviral. Se purificaron los cósmidos obtenidos y se verificó su identidad mediante digestión con enzimas de restricción.



**Figura 8. Ensamblaje del genoma adenoviral en un sistema de cósmido.** Se muestra la constitución del genoma adenoviral a partir de los cuatro plásmidos, así como la verificación de su identidad mediante digestión con enzimas de restricción. A la derecha se muestra un gel de agarosa con el patrón de bandas para *HindIII* y *SpeI*.

Posteriormente se linearizó el genoma adenoviral, el cual está caracterizado por una deleción delta 24 en el gen E1, una deleción *BglII-MfeI* de 1222 bp de longitud en la región E3, en el que se conservan los genes E3 ADP, RID $\alpha$ , RID $\beta$  y 14.7K, una fibra híbrida Ad5 / 3 y un casete de expresión CMV-(SP) -SA-E7-4-1BBL-SV40-pA insertado entre el gen de la fibra y la región E4. Se verificó la digestión completa del cósmido linearizado con la enzima *PacI*.

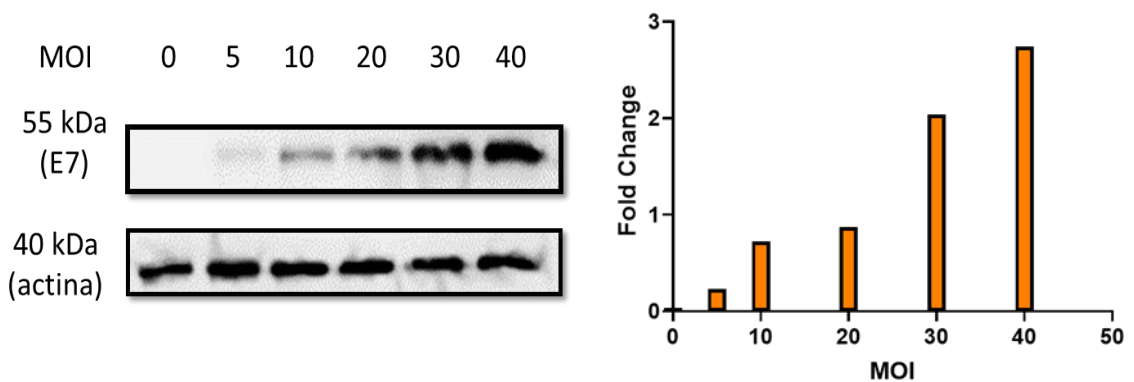
Finalmente, el genoma adenoviral linearizado se utilizó para transfectar la línea celular HEK-293 y generar así las partículas virales que se utilizaron en los ensayos posteriores.



**Figura 9. Linearización del genoma adenoviral y producción de partículas virales.** Se linearizó el genoma adenoviral con la enzima *PacI*, se verificó la digestión completa obteniendo una banda de 36921 pb y otra de 8123 pb en el gel de agarosa. Se transfectaron células HEK-293 con el ADN linearizado para obtener las partículas virales.

## EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PS/SA/E7/4-1BBL

Para demostrar la expresión de la proteína correspondiente se infectaron células HEK-293 con el adenovirus oncolítico a diferentes MOI durante 72 horas, posteriormente se detectó la proteína mediante western blot utilizando un anticuerpo específico contra E7. Como resultado se obtuvo una banda de 55 kDa que corresponde al peso molecular de la proteína de interés, además se realizó una densitometría donde podemos observar mayor expresión proteica a mayor MOI. Estos resultados están normalizados usando actina como control endógeno.

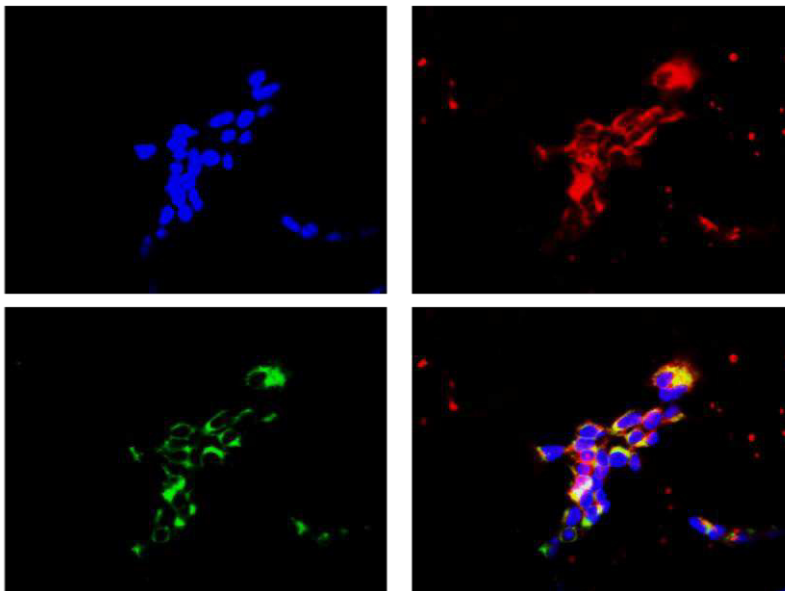


**Figura 10. Detección de la expresión de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL en la línea celular HEK-293.** Se muestran las bandas de 55 kDa correspondientes a la proteína de interés a una MOI de 0, 5, 10, 20, 30 y 40; resultados normalizados con actina como control endógeno. A la derecha gráfico de densitometría donde se observa mayor expresión de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL conforme se incrementa la MOI, respecto a la expresión de actina.

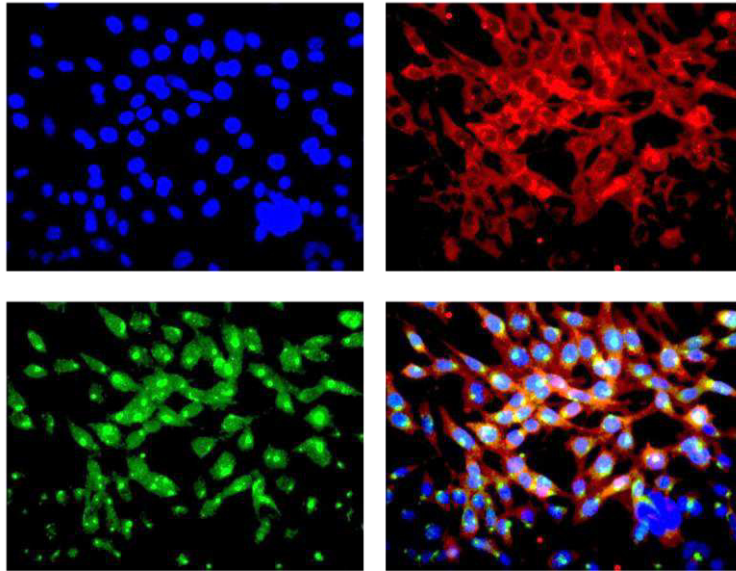
## LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA PS/SA/E7/4-1BBL

Una vez corroborada la expresión de la proteína, se determinó su localización subcelular. Para esto se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia, en el que se infectaron células HEK-293, TC-1 y NIH 3T3 con los extractos crudos de los adenovirus, una vez observado el CPE se fijaron las células y se realizó la detección de las proteínas con los anticuerpos anti-E7, así como anti-calnexina como grupo control. Ya que nuestro gen contiene un PS, esperamos que la proteína se localizara en retículo endoplásmico, mostrando un patrón de distribución observado en aquellas proteínas que se localizan en dicho organelo.

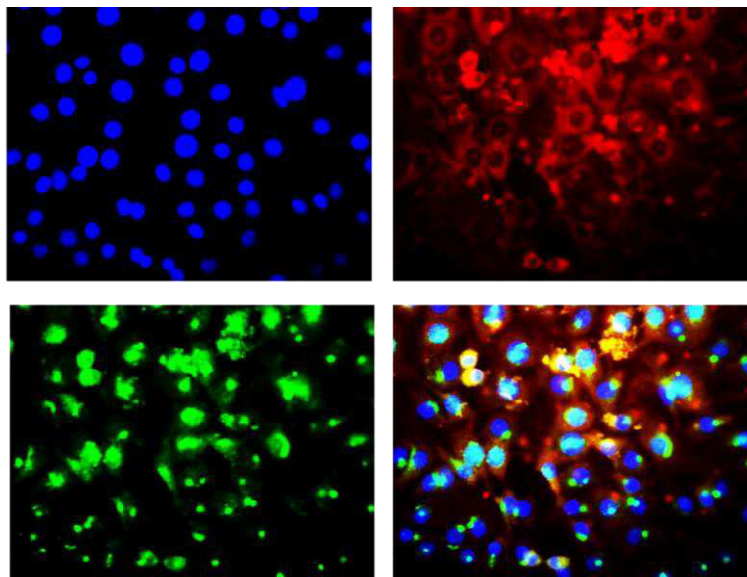
Como resultado se obtuvo señal en el canal rojo que corresponde al anticuerpo anti-E7, la señal se localiza alrededor del núcleo al igual que la señal para calnexina obtenida en el canal verde, además se muestra co-localización de ambas señales en color amarillo, lo que corrobora que nuestra proteína de interés se localiza en el retículo endoplásmico.



**Figura 11. Localización subcelular de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL en la línea celular HEK-293.** Canal azul señal de DAPI como marcador de núcleos, canal rojo señal para E7, canal verde señal para calnexina, Merge (color amarillo) se observa co-localización de las señales para E7 y calnexina. La señal para E7 muestra un patrón perinuclear característico de proteínas residentes de RE como la calnexina.



**Figura 12. Localización subcelular de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL en la línea celular TC-1.** Canal azul señal de DAPI como marcador de núcleos, canal rojo señal para E7, canal verde señal para calnexina, Merge (color amarillo) se observa co-localización de las señales para E7 y calnexina. La señal para E7 muestra un patrón perinuclear característico de proteínas residentes de RE como la calnexina.

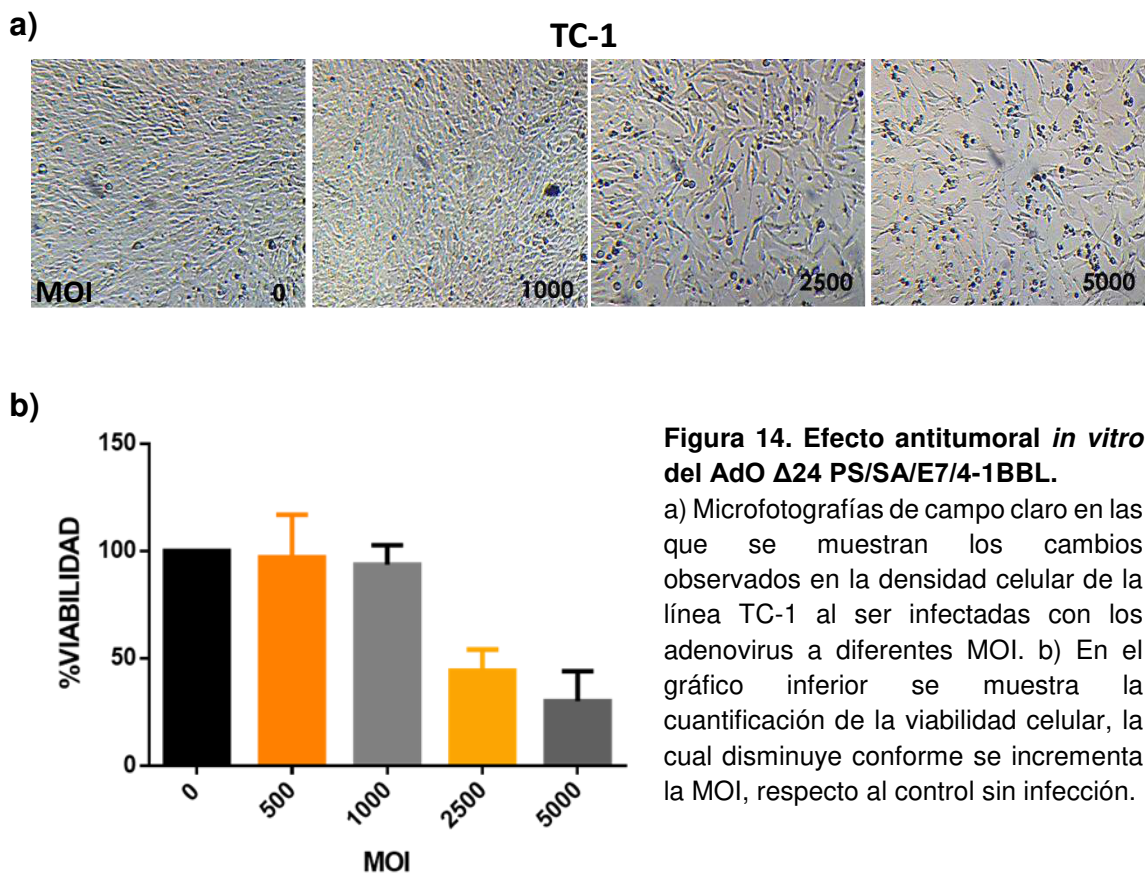


**Figura 13. Localización subcelular de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL en la línea celular NIH/3T3.** Canal azul señal de DAPI como marcador de núcleos, canal rojo señal para E7, canal verde señal para calnexina, Merge (color amarillo) se observa co-localización de las señales para E7 y calnexina. La señal para E7 muestra un patrón perinuclear característico de proteínas residentes de RE como la calnexina.



## EFFECTO ANTITUMORAL IN VITRO DEL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO

Para demostrar que los adenovirus recombinantes tienen la capacidad de lisar células tumorales se infectó la línea celular tumoral TC-1 con los adenovirus recombinantes a diferentes MOI durante 72 horas. Se monitorizó el comportamiento de las células diariamente, observando desprendimiento y disminución de la densidad celular. Para cuantificar el efecto observado se midió la viabilidad celular con tinción de cristal violeta. Como resultado se obtuvo que la viabilidad celular disminuye conforme se incrementa la cantidad de adenovirus, confirmando su capacidad de lisar células tumorales.



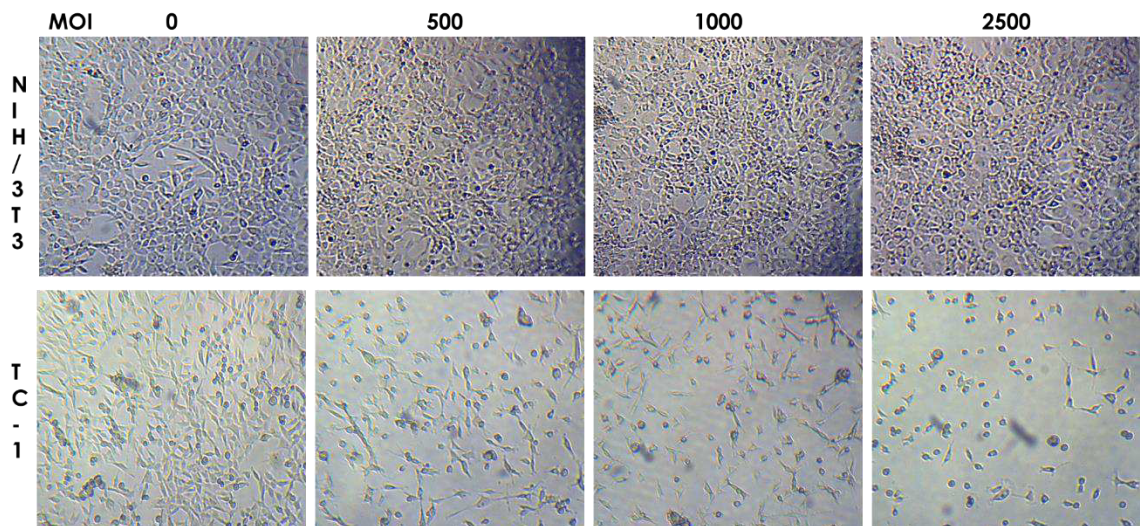
**Figura 14. Efecto antitumoral *in vitro* del AdO  $\Delta$ 24 PS/SA/E7/4-1BBL.**

a) Microfotografías de campo claro en las que se muestran los cambios observados en la densidad celular de la línea TC-1 al ser infectadas con los adenovirus a diferentes MOI. b) En el gráfico inferior se muestra la cuantificación de la viabilidad celular, la cual disminuye conforme se incrementa la MOI, respecto al control sin infección.



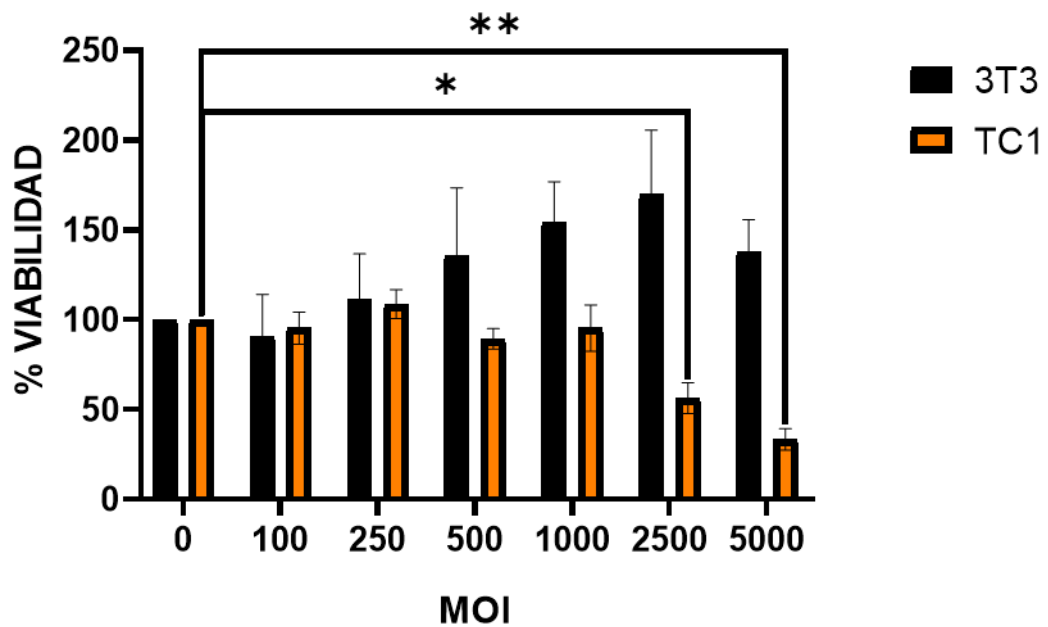
## EFFECTO ESPECÍFICO CONTRA CÉLULAS TUMORALES

Una vez demostrado el efecto del adenovirus sobre las células tumorales y verificada la expresión de las proteínas en células no tumorales se realizó un ensayo con ambas líneas celulares para demostrar un efecto específico hacia células tumorales. Para esto se infectaron las líneas celulares TC-1 y NIH/3T3 con los adenovirus recombinantes a diferentes MOI durante 72 horas. Se monitorizó el comportamiento de las células diariamente, observando desprendimiento y disminución de la densidad celular en la línea tumoral, por el contrario, la línea no tumoral no resultó afectada.



**Figura 15. Evaluación de la densidad celular de TC-1 y NIH/3T3 tras la infección con los adenovirus recombinantes.** Ambas líneas celulares fueron infectadas a diferentes MOI e incubadas por 72 hrs. En la línea tumoral TC-1 se observa desprendimiento y disminución en la densidad celular conforme se incrementa el MOI, mientras que la línea no tumoral NIH/3T3 no presenta cambios significativos.

Para cuantificar dicho efecto se realizó un ensayo de viabilidad con el reactivo MTT. Como resultado de especificidad oncolítica a las 72 horas post-infección con los adenovirus recombinantes la línea tumoral TC-1 presentó un 43% de mortalidad a un MOI de 2500 ( $p < 0.05$ ) y 67% a un MOI de 5000 ( $p < 0.01$ ), mientras que la línea celular no tumoral NIH/3T3 no presentó cambios significativos. Ambas comparadas contra su respectivo control sin infección.



**Figura 16. Viabilidad de las líneas NIH/3T3 y TC-1 infectadas con los adenovirus recombinantes.** Tras 72 horas post-infección, la línea tumoral TC-1 presenta una disminución en la viabilidad conforme se incrementa la MOI, presentando un 43% de mortalidad a un MOI de 2500 ( $p < 0.05$ ) y 67% a un MOI de 5000 ( $p < 0.01$ ), la viabilidad de la línea no tumoral no resultó afectada. Resultados de ensayos realizados por triplicado y datos analizados con el programa GraphPad Prism.

## DISCUSIÓN

---

El uso de vectores adenovirales implica utilizar un método de titulación viral, existen distintos métodos tanto físicos como biológicos. Los métodos físicos cuantifican el número de partículas virales presentes, sean funcionales o no; por otro lado, los métodos biológicos cuantifican las partículas virales infectivas mediante la presencia o ausencia de efecto citopático. De estos últimos los más comúnmente utilizados son PFU (Unidades formadoras de placa) y TCID<sub>50</sub> (Dosis infectiva 50 de cultivo tisular) (LaBarre & Lowy, 2001).

En este trabajo se utilizaron métodos biológicos debido a que proporcionan un título de partículas virales funcionales. Se usó TCID<sub>50</sub> ya que presenta ciertas ventajas sobre PFU, tales como ser dos veces más rápido de realizar y proporcionar resultados que son más fáciles de interpretar y más constantes entre los individuos.

Una vez determinada la titulación viral es importante tomar en cuenta el mecanismo utilizado por el virus para ingresar a la célula, así como el origen de las líneas celulares empleadas en los experimentos. El receptor de Coxsackie-Adenovirus (CAR) es el receptor primario encargado de acoplar el virus a la superficie celular, seguido de una interacción con las integrinas celulares. Por lo tanto en células que presentan baja o nula expresión de CAR, la vía de internalización se da exclusivamente por las integrinas (Lyle & McCormick, 2010). Las células humanas expresan CAR, por lo que pueden ser infectadas con MOI bajas, por el contrario, las células murinas carecen de dicho receptor, por lo tanto,

deben utilizarse MOI elevadas para asegurar su transducción. Tal es el caso de las líneas celulares murinas TC-1 y NIH/3T3 que en este estudio fueron infectadas con una MOI de hasta 5000.

Todos los vectores basados en adenovirus se derivan del serotipo 5 de adenovirus humano, lo que hace que estos virus sean incapaces de producir progenie en células murinas (Blair, Dixon, Griffiths, & Zajdel, 1989; Jogler et al., 2006). Sin embargo, los adenovirus humanos en células murinas pueden producir sus proteínas virales necesarias a través de la regulación de las maquinarias de transcripción-traducción de células infectadas incluso si no son capaces de producir sus progenies eficientemente (Kim et al., 2017). Lo anterior fue confirmado al demostrar que el AdO  $\Delta 24$  PS/SA/E7/4-1BBL fue capaz de dirigir la expresión de la proteína de fusión en células murinas tumorales y no tumorales.

Se demostró que el AdO  $\Delta 24$  PS/SA/E7/4-1BBL tiene la capacidad de lisar células tumorales de la línea murina TC-1, se sabe que incluso en ausencia de producción de progenie viral, la producción excesiva de proteínas virales puede resultar en la muerte celular de células murinas infectadas, posiblemente a través de un mecanismo de autofagia (Jiang et al., 2011; Klein et al., 2016).

Al demostrar que el adenovirus era capaz de infectar las células no tumorales NIH/3T3 y expresar la proteína de fusión surgió la interrogante de si dichas células resultaban afectadas en su viabilidad, por lo que se realizó un ensayo de viabilidad en ambas líneas murinas, encontrando que la línea tumoral no presentaba disminución en su viabilidad, interesantemente se registró un

aumento en la viabilidad metabólica en las células infectadas respecto al control sin infección al cuantificarse con el reactivo MTT.

Para sobrevivir y replicarse en la célula, los virus deben tomar el control de los diversos orgánulos celulares involucrados en la defensa y los procesos inmunológicos. Una vez dentro de la célula huésped, modulan varias vías de señal celular y orgánulos, incluidas las mitocondrias, y las utilizan para su propia supervivencia (Anand & Tikoo, 2013). Como se ha reportado anteriormente, el aumento de la viabilidad metabólica puede deberse a mitocondrias hiperactivas o a un aumento de la masa mitocondrial debido a que la conversión de MTT en formazan se produce principalmente en las mitocondrias (Rai et al., 2018).

El aparente incremento de viabilidad celular observado en la línea no tumoral puede deberse a un incremento en la actividad mitocondrial como consecuencia de la infección viral, y no propiamente a un aumento en el número de células ya que en la microscopia no se observó un incremento de la densidad celular.

## CONCLUSIONES

---

Se construyó un adenovirus oncolítico que porta el gen del inmunomodulador 4-1BBL fusionado al antígeno E7 (PS/SA/E7/4-1BBL).

El AdO es capaz de infectar y dirigir la expresión de la proteína PS/SA/E7/4-1BBL en células tumorales y no tumorales, con envío a retículo endoplásmico.

El AdO tiene selectividad por células tumorales.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Anand, S. K., & Tikoo, S. K. (2013). Viruses as Modulators of Mitochondrial Functions. *Advances in Virology*, 2013.  
<https://doi.org/10.1155/2013/738794>
- Baker, A. T., Aguirre-Hernández, C., Halldén, G., & Parker, A. L. (2018). Designer Oncolytic Adenovirus: Coming of Age. *Cancers*, 10(6).  
<https://doi.org/10.3390/cancers10060201>
- Berk, A. J. (2005). Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*, 24(52), 7673–7685.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209040>
- Blair, G. E., Dixon, S. C., Griffiths, S. A., & Zajdel, M. E. (1989). Restricted replication of human adenovirus type 5 in mouse cell lines. *Virus Research*, 14(4), 339–346.
- Cheuk, A. T. C., Mufti, G. J., & Guinn, B. (2004). Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Therapy*, 11(3), 215–226.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700670>
- Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P. S., McDonnell, T. J., Mitlianga, P., ... Kyritsis, A. P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*, 19(1), 2–12. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203251>
- Garza-Morales, R., Perez-Trujillo, J. J., Martinez-Jaramillo, E., Saucedo-Cardenas, O., Loera-Arias, M. J., Garcia-Garcia, A., ... Montes-de-Oca-

- Luna, R. (2019). A DNA Vaccine Encoding SA-4-1BBL Fused to HPV-16 E7 Antigen Has Prophylactic and Therapeutic Efficacy in a Cervical Cancer Mouse Model. *Cancers*, 11(1).  
<https://doi.org/10.3390/cancers11010096>
- Haupt, K., Roggendorf, M., & Mann, K. (2002). The potential of DNA vaccination against tumor-associated antigens for antitumor therapy. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 227(4), 227–237.
- Heise, C., Hermiston, T., Johnson, L., Brooks, G., Sampson-Johannes, A., Williams, A., ... Kim, D. (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Medicine*, 6(10), 1134–1139. <https://doi.org/10.1038/80474>
- Helmy, K. Y., Patel, S. A., Nahas, G. R., & Rameshwar, P. (2013). Cancer immunotherapy: accomplishments to date and future promise. *Therapeutic Delivery*, 4(10), 1307–1320. <https://doi.org/10.4155/tde.13.88>
- Howells, A., Marelli, G., Lemoine, N. R., & Wang, Y. (2017). Oncolytic Viruses- Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer. *Frontiers in Oncology*, 7, 195. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00195>
- Jiang, H., White, E. J., Ríos-Vicil, C. I., Xu, J., Gomez-Manzano, C., & Fueyo, J. (2011). Human Adenovirus Type 5 Induces Cell Lysis through Autophagy and Autophagy-Triggered Caspase Activity. *Journal of Virology*, 85(10), 4720–4729. <https://doi.org/10.1128/JVI.02032-10>
- Jogler, C., Hoffmann, D., Theegarten, D., Grunwald, T., Überla, K., & Wildner, O. (2006). Replication Properties of Human Adenovirus In Vivo and in Cultures of Primary Cells from Different Animal Species. *Journal of*



- Virology*, 80(7), 3549–3558. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3549-3558.2006>
- Khan, K. H. (2013). DNA vaccines: roles against diseases. *Germs*, 3(1), 26–35. <https://doi.org/10.11599/germs.2013.1034>
- Kilinc, M. O., Mukundan, L., Yolcu, E. S., Singh, N. P., Suttles, J., & Shirwan, H. (2006). Generation of a multimeric form of CD40L with potent immunostimulatory activity using streptavidin as a chaperon. *Experimental and Molecular Pathology*, 80(3), 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2005.12.004>
- Kim, J. W., Miska, J., Young, J. S., Rashidi, A., Kane, J. R., Panek, W. K., ... Lesniak, M. S. (2017). A Comparative Study of Replication-Incompetent and -Competent Adenoviral Therapy-Mediated Immune Response in a Murine Glioma Model. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 5, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2017.05.001>
- Klein, S. R., Jiang, H., Hossain, M. B., Fan, X., Gumin, J., Dong, A., ... Fueyo, J. (2016). Critical Role of Autophagy in the Processing of Adenovirus Capsid-Incorporated Cancer-Specific Antigens. *PloS One*, 11(4), e0153814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153814>
- 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), 1963–1967.
- LaBarre, D. D., & Lowy, R. J. (2001). Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID50 and plaque assays. *Journal of Virological Methods*, 96(2), 107–126.

Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., ... He, T.-C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*, 4(2), 43–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>

Lee, H.-W., Park, S.-J., Choi, B. K., Kim, H. H., Nam, K.-O., & Kwon, B. S. (2002). 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(9), 4882–4888.

Li, S.-Y., & Liu, Y. (2013). Immunotherapy of melanoma with the immune costimulatory monoclonal antibodies targeting CD137. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 5(Suppl 1), 47–53.  
<https://doi.org/10.2147/CPAA.S46199>

Lyle, C., & McCormick, F. (2010). Integrin  $\alpha\beta 5$  is a primary receptor for adenovirus in CAR-negative cells. *Virology Journal*, 7, 148.  
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-148>

Madireddi, S., Schabowsky, R.-H., Srivastava, A. K., Sharma, R. K., Yolcu, E. S., & Shirwan, H. (2012). SA-4-1BBL Costimulation Inhibits Conversion of Conventional CD4+ T Cells into CD4+FoxP3+ T Regulatory Cells by Production of IFN- $\gamma$ . *PLoS ONE*, 7(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042459>

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. *The Journal*

*of Biological Chemistry*, 280(50), 41472–41481.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M506881200>

Rai, Y., Pathak, R., Kumari, N., Sah, D. K., Pandey, S., Kalra, N., ... Bhatt, A. N.

(2018). Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>

Sharma, R. K., Schabowsky, R. H., Srivastava, A. K., Elpek, K. G., Madireddi,

S., Zhao, H., ... Shirwan, H. (2010). 4-1BB Ligand as an Effective Multifunctional Immunomodulator and Antigen Delivery Vehicle for the Development of Therapeutic Cancer Vaccines. *Cancer Research*, 70(10), 3945–3954. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4480>

Vinay, D. S., & Kwon, B. S. (2012). Immunotherapy of cancer with 4-1BB.

*Molecular Cancer Therapeutics*, 11(5), 1062–1070.  
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0677>

White, E. (2006). Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in

infection and tumorigenesis. *Cell Death and Differentiation*, 13(8), 1371–1377. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401941>

WHO | World Health Organization. (s/f). Recuperado el 11 de abril de 2019, de

<https://www.who.int/>

Wold, W. S. M., & Toth, K. (2013). Adenovirus vectors for gene therapy,

vaccination and cancer gene therapy. *Current Gene Therapy*, 13(6), 421–433.

Zhou, Z., Kim, S., Hurtado, J., Lee, Z. H., Kim, K. K., Pollok, K. E., & Kwon, B. S.  
(1995). Characterization of human homologue of 4-1BB and its ligand.  
*Immunology Letters*, 45(1–2), 67–73.