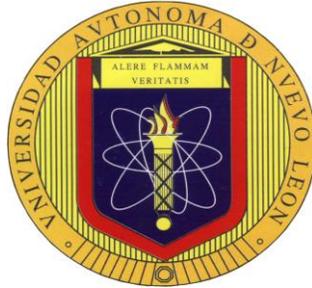


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



“Efecto de una preinmunización con *Lactococcus lactis* expresando el antígeno E7 del VPH-16 sobre la protección antitumoral inducida por adenovirus que expresan E7, IL-2 y calreticulina/E7”

**Tesis presentado por:
Blanca Rocío Rangel Colmenero,
como requisito parcial para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Morfología.**

Agosto del 2007

“Efecto de una preinmunización con *Lactococcus lactis* expresando el antígeno E7 del VPH-16 sobre la protección antitumoral inducida por adenovirus que expresan E7, IL-2 y calreticulina/E7”

Aprobación de la Tesis

Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
co-Director

Dr. Augusto Rojas Martínez
co-Director

Dr. Julio Sepúlveda Saavedra
Comisión de Tesis

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza
Comisión de Tesis

Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Posgrado

“Efecto de una preinmunización con *Lactococcus lactis* expresando el antígeno E7 del VPH-16 sobre la protección antitumoral inducida por adenovirus que expresan E7, IL-2 y calreticulina/E7”

Presentado por:

M.C. Blanca Rocío Rangel Colmenero

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Histología, Fac. de Medicina, UANL y en el Centro de Investigación Biomédicas del Noreste, IMSS, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y el Dr. Roberto Montes de Oca Luna

FIRMAS

**Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Directora de Tesis**

**Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Co-Director de Tesis**

Esta Tesis está dedicada especialmente a lo más importante que ha pasado en mi vida: MI FAMILIA y a esa segunda ilusión que en camino está.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por permitirme la vida y la oportunidad de ser quien soy.

A mi esposo e hija por su comprensión y motivación.

A la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y al Dr. Roberto Montes de Oca Luna mis Directores de Tesis, que con sus brillantes consejos y asesoría me han guiado en este difícil camino y se pudo lograr un buen trabajo de tesis.

Al mi comisión de Tesis Dr. Augusto Rojas Martínez, Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza y al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por su asesoría.

A CONACYT por el apoyo en este trabajo de Investigación y la aprobación de una beca de posgrado.

Al Centro de Investigación Biomédicas del Noreste, IMSS, por su apoyo hacia este trabajo de investigación.

A los Departamentos de Histología, Bioquímica, Inmunología y Hematología de la Facultad de Medicina, UANL por permitirme realizar parte de esta investigación dentro de sus instalaciones.

Al CINVESTAB por habernos facilitado el uso del Microscopio Confocal con Fluorescencia.

Al Dr. Adrián J. Rosas Taraco, al M.C. Cristian Silva Platas, al Dr. Jorge Gómez Gutiérrez y al Dr. Arturo Chávez por su amistad y consejos para mejorar en las metodologías que se utilizaron en este trabajo.

A mis compañeros y amigos.

GRACIAS...

CONTENIDO TEMÁTICO

Resumen	1
Capítulo 1	
Introducción	2
Capítulo 2	
Antecedentes	5
2.1. Cáncer cérvico-uterino	5
2.2. Virus del Papiloma Humano	6
2.2.1. Biología del VPH	6
2.2.2. Patogénesis	8
2.2.3. Mecanismos de Evasión Tumoral	11
2.3. Respuesta Inmune	13
2.3.1. Calreticulina	15
2.4. Vacunas	17
2.4.1. Adenovirus	21
2.4.2 <i>Lactococcus lactis</i>	23
2.5. Modelo Animal para Cáncer cérvico-uterino	24
Capítulo 3	
3.1. Justificación	25
3.2. Hipótesis	26
3.3. Objetivo	26
3.3.1. Objetivos Específicos	27
Capítulo 4	
Material y Método	28
4.1. Ratones y Líneas Celulares	28
4.2. Vector Adenoviral	29
4.3. Preparación de Células Bacterianas	30
4.4. Preparación de Vectores Adenovirales	30
4.4.1. Producción Adenoviral	31
4.4.1.1. Preamplificación del adenovirus	31
4.4.1.2. Producción a gran escala del adenovirus	32
4.4.1.3. Purificación de Vectores Adenovirales	33
4.5. Detección de la expresión de E7 en <i>Lactococcus lactis</i>	35
4.6. Inmunización intranasal de los ratones con <i>Lactococcus lactis</i> que expresa E7 del HPV-16	37
4.7. Inducción Tumoral en los ratones C57/BL6	38
4.8. Tratamiento terapéutico con los vectores adenovirales que expresan E7, CRT/E7 e IL-2	39
4.9. Tratamiento combinado profiláctico y terapéutico	41
4.10. Evaluación del crecimiento Tumoral	41

4.11. Análisis de supervivencia	42
4.12. Sacrificio y Obtención de tejidos	42
4.13. Detección de IFN- γ	43
4.14. Análisis de citometría de flujo	43
4.15. Preparación de las piezas de tumor para su análisis histológico	44
4.16 Análisis morfológico de los cortes de tumor	45
4.17. Evaluación de la inducción de apoptosis en los tumores	45
4.18. Detección de linfocitos T CD8 ⁺ mediante inmunohistoquímica	46
Capítulo 5	
Resultados	47
5.1. La Calreticulina incrementa dramáticamente el efecto antitumoral de un adenovirus que expresa E7	47
5.2. La preimmunización intranasal con <i>Lactococcus lactis</i> -E7 potencia el efecto Antitumoral de Ad-CRT/E7	48
5.3. El tratamiento con <i>Lactococcus lactis</i> -E7 y adenovirus-CRT/E7 produce Un mayor porcentaje de ratones con regresión tumoral completa	53
5.4. Los tumores en regresión del tratamiento combinado de <i>Lactococcus Lactis</i> -E7 y Ad-CRT/E7 presentan infiltración de linfocitos T CD8 ⁺	54
5.5. Inducción de apoptosis en los tumores en regresión	56
5.6. Inducción de IFN gamma en los ratones con tumor en regresión	59
Capítulo 6	
Discusiones	61
Capítulo 7	
Conclusiones	65
Capítulo 8	
Literatura Citada	66
Anexo I Preparación de soluciones	73
Resumen Curricular	79

INDICE DE FIGURAS

1. Esquema de Genoma Viral	7
2. Patogénesis del VPH oncogénico	9
3. Caracterización de la expresión de los genes del VPH en lesiones benignas y malignas	11
4. Función de la calreticulina en el procesamiento de antígenos	16
5. Ratón de la cepa C57BL/6	28
6. Línea celular TC-1	28
7. Casete de expresión para CRT/E7 en el adenovirus y detección de E7 y CRT/E7 mediante Western blot	29
8. Inmunización intranasal	37
9. Implante de células TC-1	39
10. Aplicación del tratamiento terapéutico	40
11. Análisis del efecto antitumoral de un adenovirus que expresa calreticulina fusionada a E7	49
12. Análisis del efecto antitumoral de un tratamiento combinado de LI-E7 Y adenovirus con CRT/E7	52
13. Porcentaje de ratones libres de tumor	53
14. Análisis histológico y por inmunofluorescencia de linfocitos T en los tumores en regresión	55
15. Cuantificación de linfocitos T y NK en los tratamientos con regresión tumoral por citometría de flujo en los bazos de ratones con tumor	57
16. Detección de apoptosis por ensayo de TUNEL en tumores en regresión	58
17. Detección de IFN- γ en los tumores en proceso de regresión	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CaCu	Cáncer cérvico-uterino
VPH	Virus del Papiloma Humano
L1	Proteínas estructurales de la cápside viral
L2	Proteínas estructurales de la cápside viral
E6	Proteína del virus del papiloma humano
E7	Proteína del virus del papiloma humano
CTL	Linfocitos T citotóxicos
NK	Células asesinas naturales
CRT	Calreticulina
VPH-16	Virus del Papiloma Humano tipo 16
ADN	Acido desoxiribonucleico
%	Por ciento
80's	Ochentas
LCR	Región de control larga del VPH
p53	Gen supresor de tumor
pRb	Gen del retinoblastona
G1	Fase del ciclo celular
S	Fase del ciclo celular
E2F-1	Factor de transcripción celular
DC	Células dendríticas
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
Th	Células T ayudadoras
TCD8 ⁺	Linfocitos T CD 8 positivos
TCD4 ⁺	Linfocitos T CD4 positivos
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
HSP	Proteínas de choque térmico
kDa	Kilo Daltones
APC	Células presentadoras de antígeno
TAP-1	Transportadores asociados en el procesamiento de antígeno tipo I
TAP-2	Transportadores asociados en el procesamiento de antígeno tipo II

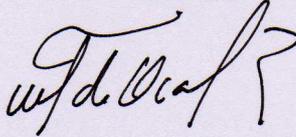
VLPs	Partículas parecidas a virus del papiloma
IL2	Interleucina 2
HEK 293	Tipo celular deficiente de E1A y E3A
E1A	Gen temprano del adenovirus
E3A	Gen temprano del adenovirus
DO	Densidad óptica
PBS	Buffer de fosfatos salino
UFC	Unidades formadoras de colonias
CPE	Efecto citopático
SFB	Suero Fetal Bovino
DMEM	Dulbeco's modified eagle medium
rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grados centígrados
mM	Milimolar
ul	Microlitros
CM	Cloramfenicol
ng	Nanogramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
UV	Ultravioleta
TC-1	Células tumorales línea TC-1

“Efecto de una preinmunización con *Lactococcus lactis* expresando el antígeno E7 del VPH-16 sobre la protección antitumoral inducida por adenovirus que expresan E7, IL-2 y calreticulina/E7”

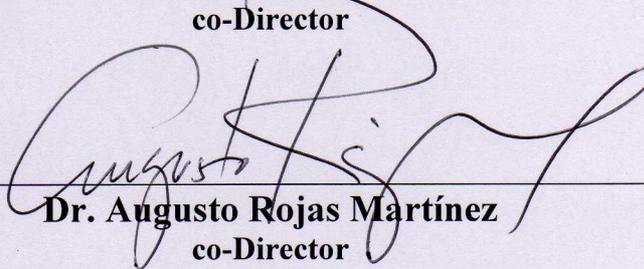
Aprobación de la Tesis



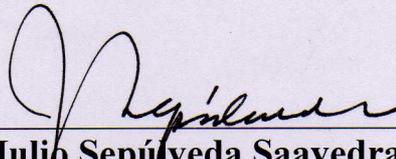
Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Director



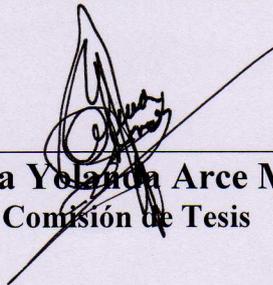
Dr. Roberto Montes de Oca Luna
co-Director



Dr. Augusto Rojas Martínez
co-Director



Dr. Julio Sepúlveda Saavedra
Comisión de Tesis



Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza
Comisión de Tesis

Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

M.C. Blanca Rocío Rangel Colmenero

Fecha de Graduación: Agosto del 2007

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título: “Efecto de una preinmunización con *Lactococcus lactis* expresando el antígeno E7 del VPH-16 sobre la protección antitumoral inducida por adenovirus que expresan E7, IL-2 y calreticulina/E7”

Número de páginas: 78

Candidato para el grado de Doctor en
Ciencias con especialidad en Morfología

Area de estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio. El cáncer cérvico uterino (CaCu) representa uno de los problemas más graves de salud pública a escala mundial y se considera como la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer alrededor del mundo. En México es considerado como la primera causa de muerte por neoplasias en la mujer. Más del 90% de los tumores de CaCu está asociado a VPH por lo que el control de la infección de este virus es de suma importancia. Los objetivos de nuestro trabajo fue determinar si el adenovirus que expresa E7 fusionado a calreticulina (Ad-CRT/E7) posee una mayor actividad antitumoral que el que expresa E7 (Ad-E7), y si este efecto se potencia con la preinmunización con *Lactococcus lactis* que expresa el antígeno E7. Para cumplir con nuestros objetivos se estableció un modelo tumoral murino mediante la inoculación de células TC-1 que expresan el antígeno E7. Posteriormente se aplicaron intratumoralmente los adenovirus Ad-CRT/E7, Ad-E7 y Ad-IL2 y se midió el desarrollo del tumor en función del tiempo. Para los experimentos combinados de *L. lactis* y adenovirus se realizó lo siguiente: (1) Preinmunización profiláctica vía nasal con *L. lactis* que expresa el antígeno E7 adherido a su pared, (2) establecimiento del tumor con células TC-1, (3) administración intratumoral de los adenovirus (Ad-CRT/E7 y Ad-E7), y (4) monitoreo del crecimiento tumoral. Se registró la supervivencia y se midió la respuesta inmune celular.

Contribuciones y Conclusiones. Los ratones tratados con el Ad-CRT/E7 mostraron mayor inhibición del crecimiento tumoral que la observada con los Ad-E7 y Ad-IL2. Además en el tratamiento combinado del *L. lactis*-E7 y Ad-CRT/E7 la mayoría de los ratones presentaron una regresión tumoral total y un mayor porcentaje de supervivencia que los otros tratamientos. Esto debido en parte a una mayor respuesta inmune celular dado por una mayor infiltración de linfocitos T CD8⁺, apoptosis y una concentración elevada de IFN- γ . Con nuestros resultados podemos concluir que: la calreticulina potencia notablemente el efecto inmunogénico y antitumoral del antígeno E7, la preinmunización con *L. lactis* expresando E7 en su superficie mejora el efecto terapéutico antitumoral y porcentaje de supervivencia y que el efecto antitumoral observado correlaciona con la inducción de una respuesta inmune celular.

Dra. Odila Saucedo Cárdenas
Directora de Tesis

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es la primera causa de muerte por neoplasia en la mujer en los países en desarrollo, de allí la importancia de contar con una vacuna para el control y tratamiento del mismo^{1,2}.

En más del 99% de los casos de CaCu, el virus del papiloma humano (VPH) se ha identificado como agente causal siendo el tipo 16 y 18 los más prevalentes por lo que la producción de vacunas contra VPH se han dirigido hacia estos tipos de virus con el fin de disminuir la incidencia mundial de CaCu².

El conocimiento de la biología del VPH³⁻⁶ ha permitido establecer diferentes estrategias para la producción de vacunas contra el CaCu. Las vacunas que se comercializan hasta el momento son en su mayoría tratamientos profilácticos dirigidos a producir anticuerpos neutralizantes contra proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral de VPH⁷⁻¹⁰. Y más recientemente ha sido introducida al mercado una vacuna tetravalente, dirigida hacia los tipos VPH 6,11, 16 y 18. Más sin embargo, estas vacunas son preventivas y no atacan el problema actual que tenemos en México: el alto número de mujeres que ya presentan la enfermedad y que no existe un tratamiento efectivo, que aumente la esperanza de vida para las mujeres afectadas por este mal.

Actualmente, varios grupos de investigación están trabajando en la obtención de vacunas terapéuticas que se basan en las proteínas virales E6 y E7 y su administración en

modelos animales ha dado buenos resultados^{7,11-13}, y algunas de ellas ya están en fase clínica⁷⁷.

Estudios en modelos animales han demostrado que la inmunización con las proteínas E6 ó E7 del VPH-16 desencadena una buena respuesta inmune celular. Entre los tipos celulares que se han encontrado en dicha respuesta están principalmente los linfocitos T citotóxicos (“CTL” por sus siglas en inglés) también conocidos como CD8⁺ y las células asesinas naturales (“NK” por sus siglas en inglés). La activación de ambas células, converge en la señalización intracelular que activa las enzimas proteolíticas llamadas caspasas, involucradas en el proceso de apoptosis que ocasiona la destrucción de las células cancerosas¹⁴⁻¹⁶.

Por otro lado, con el fin de mejorar la respuesta inmune que se ha logrado hasta la fecha, se están utilizando proteínas unidas al antígeno de interés para potenciar la respuesta inmune. Una de estas proteínas, es la calreticulina (CRT), que se encuentra en el retículo endoplásmico, donde tiene dos funciones principales: regular la homeostasis de Ca²⁺ y actuar como chaperona en la presentación de antígenos^{17,18}. Previos estudios han empleado CRT unida a un antígeno del VPH-16 que puede ser E7 o E6, y han observado un importante efecto antitumoral¹⁹⁻²⁴.

Al diseñar una vacuna, hay que tener en cuenta el modo de presentar el antígeno, ya que esto es un factor determinante para su efectividad. Actualmente los adenovirus son vectores ampliamente usados para expresar proteínas recombinantes. Estos vectores son

construcciones artificiales en las que se realizan modificaciones en el genoma viral, mediante el reemplazo de algunos segmentos con ADN de una fuente diferente.

Otros microorganismos utilizados como vectores son las bacterias probióticas como es, *Lactococcus lactis*. Esta bacteria ácido láctica se ha estudiado extensamente y manipulada para la producción de proteínas heterólogas²⁵⁻³². La producción de este microorganismo es sencilla, rápida y económica por lo que lo hace una herramienta ideal en la elaboración de vacunas que se puedan utilizar en la población en general.

Nuestro grupo ha logrado expresar exitosamente el antígeno E7 utilizando como vector *L. lactis*, y hemos demostrado que su administración por vía intranasal activa una respuesta inmune celular específica para E7³³⁻³⁴.

En el presente trabajo evaluamos la efectividad de una preinmunización con este *L. lactis* expresando el antígeno E7 de VPH-16 en combinación con la aplicación terapéutica intratumoral de un adenovirus que expresa E7 fusionado a la proteína CRT. Esta combinación indujo una fuerte respuesta inmune específica contra el antígeno E7 provocando una inhibición significativa del desarrollo tumoral.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

2.1. Cáncer cérvico-uterino

El cáncer cérvico-uterino se origina en la mucosa del cuello uterino, porción inferior y estrecha del útero que desemboca en la vagina.

En los países desarrollados, el cáncer cervical es usualmente el cáncer más común y puede constituir arriba del 25% de todos los cánceres en la mujer³⁵. El cáncer cervical es precedido solo por el cáncer de mama como la causa más común de muerte por cáncer en la mujer en el mundo³⁶. Las tasas de mortalidad por cáncer en México muestran una marcada tendencia creciente en las últimas décadas. Los tumores malignos en México ocupan el segundo lugar como causa de muerte en la población general y, dentro de éstos, el cáncer cervical representa el tercer lugar como causa de defunción por neoplasias malignas y el primer lugar si se toma en cuenta sólo el sexo femenino, únicamente antecedido por los tumores de pulmón y estómago en primero y segundo lugar, respectivamente. Asimismo, dicha neoplasia constituye 21.4% del total de las neoplasias malignas, 35% de las que afectan a la mujer y 85% de las ginecológicas³⁷. En 1994 en el estado de Nuevo León este tipo de cáncer ocupó el segundo lugar en frecuencia de mortalidad por neoplasias malignas³⁸.

La asociación entre la infección genital del VPH y el cáncer cervical se demostró a principios de los 80's³⁹. En 1996 la asociación de salud mundial reconoce al VPH como la principal causa de cáncer cervical. Más de 200 tipos de VPH han sido agrupados en base a

la secuencia de DNA y alrededor de 85 genotipos están bien caracterizados. El virus del papiloma humano infecta las células del epitelio basal de la piel y está clasificado como tipo cutáneo y mucoso. El tipo cutáneo es epidermiotrópico y está dirigido a la piel de las manos y pies. El tipo mucoso infecta la boca, garganta, tracto respiratorio o epitelio anogenital. Basándose en la asociación con el cáncer cervical, los VPH se agrupan en tipos de alto y bajo riesgo oncogénico. Los tipos de VPH de bajo riesgo son el 6, 11, 42, 43 y 44. Los VPH de alto riesgo son 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70⁴. Se han identificado alrededor de 30 tipos de VPH que son transmitidos por contacto sexual que infectan primariamente el cérvix, vagina, vulva, pene y ano. Entre los tipos más frecuente se encuentra el tipo 16 con un 50% de los casos y le siguen el tipo 18 con un 12%, el 45 con un 8% y el 31 con un 5%^{35,40}. Los VPH han sido implicados por arriba del 90% de los casos de cáncer de células escamosas cervical alrededor del mundo⁴⁰⁻⁴².

2.2. Virus del Papiloma Humano

2.2.1. Biología del VPH

Los papilomavirus son miembros de la familia Papovaviridae. El VPH es relativamente pequeño de 55 nm de diámetro, tiene una cápside icosaédrica compuesto de 72 capsómeras que contienen dos proteínas de la cápside L1 y L2. Cada capsómera es un pentámero de la proteína L1. Cada cápside del virión contiene algunas copias (aproximadamente 12 por virión) de la proteína de la cápside menor L2⁴³.

El genoma del VPH consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena, conteniendo aproximadamente 7,900 pares de bases. Este genoma se divide en tres

regiones: una región de transcripción temprana que comprende los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7; una región tardía compuesta de los genes L1 y L2 y una región larga de control (“LCR” por sus siglas en inglés). La región temprana codifica proteínas reguladoras de la transcripción y la replicación y dos proteínas importantes en el proceso de transformación (E6 y E7); esta región se expresa en los queratinocitos proliferantes y no diferenciados. La región tardía comprende las proteínas de la cápside viral y se expresa en los queratinocitos diferenciados⁴⁴. La región LCR es una región regulatoria no codificante de 100 a 400 pares de bases, contiene el origen de replicación del ADN, uno o dos promotores, activador transcripcional, represor de los sitios de unión a la proteína y el sitio de poliadenilación del ARN; en este ocurren muchas interacciones complejas entre las proteínas reguladoras virales y del hospedero⁴ (Fig. 1).

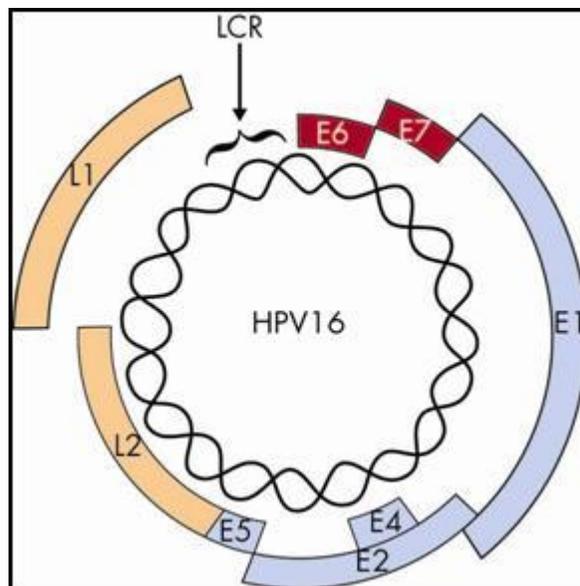


Fig. 1 Esquema del genoma adenoviral.

2.2.2. Patogénesis

Los VPH son virus epiteliotrópicos que infectan la capa basal de epitelios queratinizados y mucosos. Sus efectos clínicos principalmente en forma de verrugas son el resultado de la estimulación viral de la proliferación y su interferencia con la diferenciación normal epitelial. Estas lesiones pueden observarse entre las 3 semanas y 8 meses después de la infección. A pesar de que la mayoría de las lesiones causadas por los VPH son benignas, existen ciertos tipos que están relacionados con el cáncer cervicouterino, debido a esto, los diferentes genotipos de VPH se clasifican de acuerdo al riesgo oncogénico en: alto (16, 18, 45 y 56), intermedio (31,33, 35, 51, 52 y 58) y bajo (6, 42, 43 y 44)⁵.

Aproximadamente 35 genotipos de VPH infectan el área anogenital. Virtualmente todos los pacientes con infección por genotipos de bajo riesgo y la mayoría de infectados con genotipos de alto riesgo, resuelven la infección. No obstante, se cree que las mujeres que continúan infectadas por genotipos oncogénicos presentan finalmente displasia o cáncer cervical. En el cáncer cervical se ha encontrado el VPH en el 99.7% de los casos. El 11.8% de la incidencia de cáncer en el mundo se debe a la infección por VPH siendo el genotipo VPH-16 el virus más prevalente, seguido por el VPH-18. Por tal motivo, los esfuerzos en la fabricación de vacunas contra VPH se han encaminado principalmente hacia estos virus con el fin de disminuir la incidencia mundial de cáncer anogenital².

Se asume que el ciclo de replicación del VPH empieza con la entrada del virus dentro de las células del estrato germinativo del epitelio. Para que esto ocurra es necesario la abrasión o microtrauma de la epidermis. La integrina $\alpha 6$ ha sido propuesta como el

receptor de las células epiteliales para el VPH-6 pero no obligatoriamente para el anclaje de VPH-11 o VPH-33. El VPH-16 y VPH-33 se anclan a la superficie por la vía heparán-sulfato celular del hospedero⁴⁵. En la capa basal, la replicación viral se considera que es no productiva y el virus se establece de forma episómica con un bajo número de copias, al utilizar la maquinaria de replicación de la célula sintetizando una copia de su DNA aproximadamente por ciclo celular, se le considera una lesión benigna. En las lesiones malignas, este se integra en el ADN del huésped entre la región E1 y E2 viral, lo cual ocasiona una desregulación en la expresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7. Estas por su parte, actúan bloqueando la función de los genes supresores de tumor p53 y el gen del retinoblastoma (pRb), respectivamente, ocasionando la progresión prematura de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, y por tanto la inmortalización celular (Fig. 2).

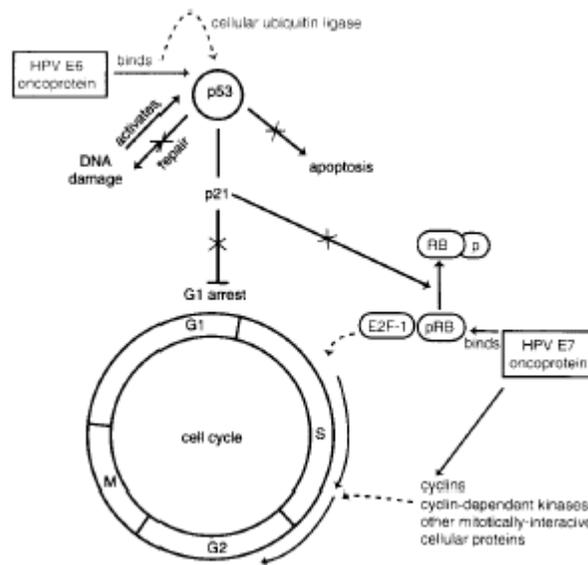


Figura 2. Patogénesis del VPH oncogénico. Los genes E6 y E7 del VPH codifican para proteínas multifuncionales que se unen primariamente a las proteínas celulares p53 y pRB, interrumpiendo sus funciones y alterando la regulación del ciclo celular y por lo tanto la transformación celular.

El crecimiento celular es regulado grandemente por dos proteínas celulares, las proteínas supresoras de tumor, p53 y pRB. El producto del gen E6 del VPH se une a p53 y lo lleva a su rápida degradación por ubiquitinación. Esta degradación tiene el mismo efecto que una inactivación por mutación. Como consecuencia, las actividades normales de p53 como son el arresto en G1, apoptosis y reparación del DNA son eliminadas⁶. El producto del gen E7 del VPH se une a la forma fosforilada de las proteínas de la familia RB. Esta unión rompe el complejo entre pRB y el factor de transcripción celular E2F-1, resultando en la liberación de E2F-1, el cual permite la transcripción de genes cuyos productos son requeridos por la célula para entrar a la fase S del ciclo celular. El gen E7 puede además asociarse con otras proteínas mitóticas como la ciclina E³. Los productos del gen E2 son proteínas unidas al DNA con las cuales se bloquea la transcripción de los genes E6 y E7 y permiten que el producto del gen E1 se una al origen viral de replicación localizado en la LCR. Esta unión inicia la replicación del genoma viral en la fase S del ciclo celular. El número de copias genómicas es mantenido en un nivel constante en estas células y un bajo nivel de transcritos son expresados. Después, se activan los promotores tardíos que activan la cápside, L1 y L2. Las partículas virales son ensambladas en el núcleo y los viriones completos son liberados cuando las capas queratinizadas del epitelio son liberadas. El gen E4 participa en el proceso de maduración y liberación de las partículas del papilomavirus⁴.

Las lesiones benignas el VPH tienen un patrón específico de expresión génica. Los genes tardíos (proteínas de la cápside viral) solo se expresan en las capas diferenciadas y superficiales del epitelio mientras que los genes tempranos inician su expresión a medida que ocurre la diferenciación del epitelio. La formación de las partículas virales infectantes (viriones) en las capas más superficiales del epitelio asegura la transmisión de la infección,

al producirse la descamación de los queratinocitos infectados. En contraste, cuando ocurre la transformación carcinomatosa, el ADN viral se integra al ADN celular, predominando la expresión continua de los genes tempranos (particularmente de las oncoproteínas E6 y E7) y se aborta la producción de partículas virales o viriones. Lo anterior ocasiona una proliferación continua y descontrolada de los queratinocitos² (Fig. 3).

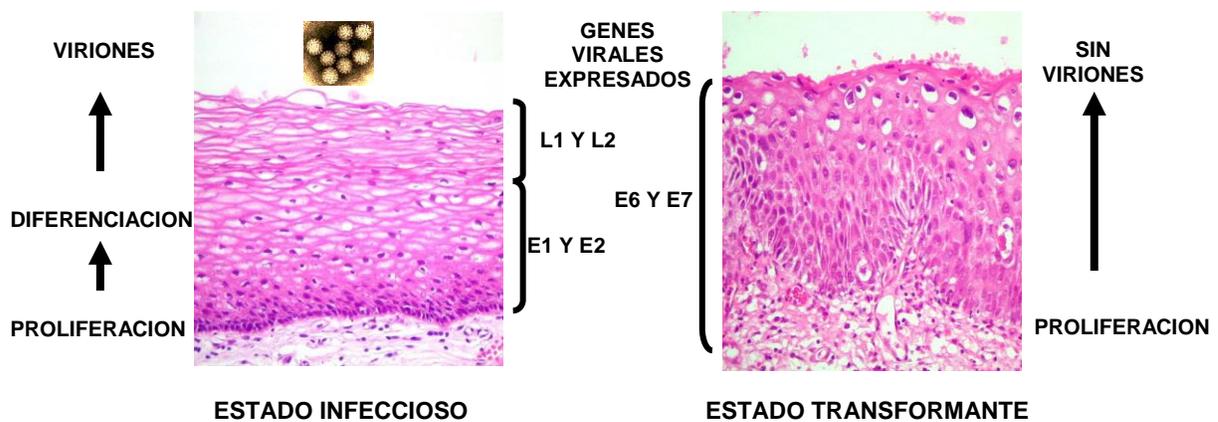


Figura 3. Caracterización de la expresión de los genes del VPH en lesiones benignas y malignas.

2.2.3. Mecanismos de evasión tumoral

La coevolución del papillomavirus con las células de mamíferos, ha producido mecanismos por el cual el papillomavirus puede evadir el mecanismo de la respuesta inmune del hospedero específica y no específica. El patrón de infección, crónica o latente, y la aparición de brotes con efectos citopáticos, es dependiente de las condiciones celulares del huésped. Los procesos de evasión pueden ocurrir por diferentes vías; en ciertos casos los virus presentan antígenos de superficie muy variables que conducen a síntesis de un exceso de anticuerpos no neutralizantes, que pueden llegar a interferir con los que si tienen

esa capacidad de neutralización. Otro mecanismo de evasión se ha observado en ciertos tumores, en los que la respuesta inmunitaria se evita mediante la depleción de la expresión de moléculas del MHC. Muchas infecciones virales toman como diana a células inmuno competentes como CD4+ y células de Langerhans, comprometiendo así la eliminación de la infección por alteración de los mediadores en el montaje de la respuesta inmune ⁴⁴. Una ventaja que posee este virus es que no produce lisis celular por lo cual los antígenos virales no parecen estar disponibles para ser presentados por las células presentadoras de antígenos y por lo tanto se limita la inducción de CTL específicos⁴⁶.

El patrón específico de expresión génica del VPH ocasiona bajos niveles de expresión de las proteínas del papillomavirus en las células epiteliales basales infectadas y aunado con la ausencia de infiltración y la lisis celular inducida por virus, se restringe la oportunidad de la presentación efectiva de las proteínas del VPH a los inmunocitos por las células dendríticas (“DC” por sus siglas en inglés)⁴⁶.

Puntualizando, las proteínas E1 y E2 tienen un bajo nivel de expresión, además de que se localizan en el núcleo donde son difícilmente reconocidas por el sistema inmunológico. Las proteínas E6 y E7 además de estar bien localizadas en el núcleo y de presentar un nivel bajo de expresión, este es suficiente para inducir proliferación y retrasar el fenómeno de diferenciación. Las proteínas E4, L1 y L2 se localizan tanto en citoplasma como en el núcleo y se expresan solo en los queratinocitos bien diferenciados, los cuales son rápidamente descamados del epitelio, impidiendo su adecuado reconocimiento por el sistema inmune⁴⁶.

En general la gran mayoría de péptidos o antígenos de las células cancerosas son pobremente inmunogénicos. Las células tumorales frecuentemente disminuyen la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (“MHC-I” por sus siglas en inglés) o inducen mutaciones en el gen de la β 2-microglobulina como estrategia para evadir su reconocimiento por parte del sistema inmune⁴⁷.

2.3. Respuesta inmune

La inmunidad celular adaptativa ejerce una respuesta específica hacia el agente viral injurioso y va a estar dada por las células efectoras específicas y por las células de memoria que van a repeler un ataque posterior. A medida que la infección viral avanza, se dispara la inmunidad adaptativa en la cual se activan los CTL, las células T ayudadoras (Th) y los anticuerpos antivirales⁴⁴.

La respuesta inmune humoral permite la mayoría de las veces detener la diseminación de virus a otras células con la secreción de proteínas (anticuerpos) por los linfocitos B, estos anticuerpos neutralizan los agentes extraños gracias a la unión específica con un antígeno^{16,17}. En este tipo de inmunidad adquieren importancia las inmunoglobulinas y los receptores antigénicos de las células T. Las inmunoglobulinas son glicoproteínas presentes tanto en el suero como en los líquidos tisulares, pueden ser generados contra cualquier proteína viral y actúan activando el complemento produciendo lisis celular y son mediadores de la activación de células efectoras citotóxicas⁴⁸.

La respuesta inmune celular está caracterizada por la acción conjunta de linfocitos y macrófagos cuyo fin es la destrucción o neutralización del agente extraño⁴⁹. Las células T reconocen antígenos asociados al MHC, de esta forma, las MHC-I y II actúan como sistemas guías para las células T. Los antígenos son presentados por el MHC en la superficie celular en forma de péptidos previamente procesados. Las células que procesan el antígeno corresponden ya sea a células presentadoras de antígeno (“APC” por sus siglas en inglés), profesionales o a células infectadas que expresan el antígeno viral⁴⁸.

Los linfocitos T CD8⁺ y células T cooperadoras de tipo 1 (Th1), también conocidos como CD4⁺, son los principales componentes de la respuesta inmune celular. Los CTL son las principales células activadas inicialmente ante una infección viral y mediante la expresión de MHC-1 identifican y eliminan a las células infectadas por el virus. Básicamente cualquier proteína viral puede ser procesada para generar péptidos que son transportados al retículo endoplásmico rugoso en donde se unen a moléculas MHC-I y a la β 2-microglobulina y este complejo es transportado hacia la superficie celular para ser reconocidas. Por otra parte los linfocitos CD4⁺ reconocen los antígenos expresados en macrófagos y células B asociados con MHC-II. El complejo MHC-II/péptido antigénico es reconocido por el receptor de la célula T y esta interacción no solo es inmuno específica sino que, para que se produzca una adecuada presentación antigénica, se requiere la acción de moléculas coestimuladoras que en caso de estar ausentes se produce un estado de tolerancia inmunológica. Una vez que las células T son activadas, se liberan citocinas como el interferón- γ (IFN- γ), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor) y el ligando CD40 que

incrementa la función de presentación antigénica y es la señal activadora principal del linfocito B⁴⁸.

2.3.1 Calreticulina

La calreticulina es una proteína de choque térmico (“HSP” por sus siglas en inglés) de 46 kDa que se encuentra en el retículo endoplásmico, donde tiene dos funciones principales: regular la homeostasis de Ca^{2+} y actuar como chaperona^{17,18} al asociarse a los péptidos y transportarlos dentro del retículo, se considera que juega un papel muy importante en el procesamiento de antígenos⁵⁰.

El retículo endoplásmico es un organelo intracelular esencial que juega un rol vital en muchos procesos celulares como la síntesis, plegamiento y modificación postranscripcional asociado a membrana, secreción, contracción-relajación, motilidad celular, expresión génica, progresión del ciclo celular y apoptosis⁵¹⁻⁵³.

Dentro del lumen de este organelo podemos encontrar una gran concentración de proteínas involucradas en todos los aspectos de funcionamiento del retículo endoplásmico. Muchas de estas proteínas se unen y almacenan calcio además de funcionar como chaperonas. Ellas intervienen en el plegamiento y control de calidad de la síntesis de nuevas proteínas⁵⁴⁻⁵⁶. Un grupo de estas proteínas son las HSP. Las HSP se encuentran en el citosol y en el retículo endoplásmico y se ha visto que intervienen en la inmunidad celular antígeno específica contra antígenos tumorales, antígenos virales y antígenos de histocompatibilidad menor. Las bases para esta habilidad general en la respuesta inmune

consiste en la función de unirse a un gran repertorio de péptidos, incluyendo los péptidos antigénicos de cualquier célula o tejido, para que después sea captado por las células presentadoras de antígenos (“APC” por sus siglas en inglés) y los péptidos sean procesados y presentados en su superficie por las moléculas del MHC I para estimular a los linfocitos T CD8+ antígeno específicos. Se ha propuesto que las HSP transportan péptidos desde el punto donde fueron generados en el citosol hasta el MHC I del retículo endoplásmico para su presentación^{18, 50, 56-63}.

La CRT pertenece a la familia de las proteínas de choque térmico que se ha visto se asocia con péptidos libres en el lumen del retículo endoplásmico que son liberados por transportadores asociados con el procesamiento del antígeno, TAP-1 Y TAP-2 (“TAP” por sus siglas en inglés) y con moléculas de microglobulina β -2 y MHC clase I B2^{18,22,50,56-59} (Figura 4).

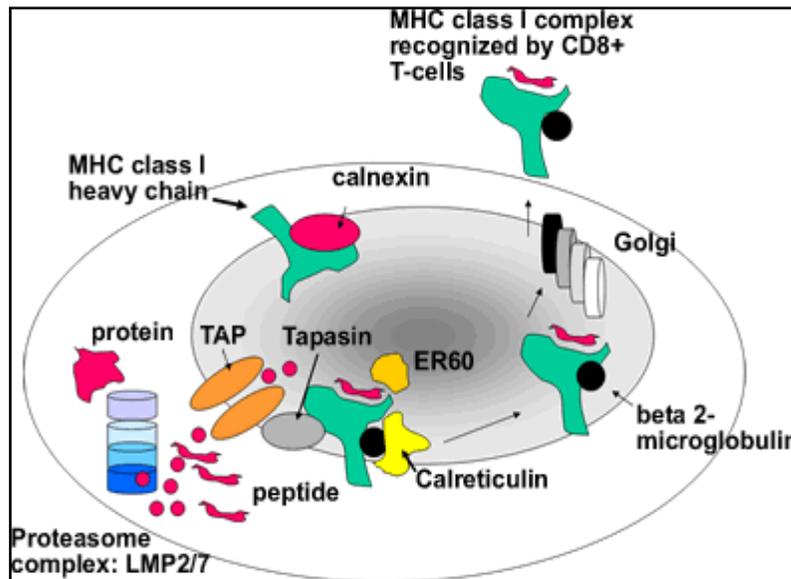


Figura 4. Función de la calreticulina en el procesamiento de antígenos.

La unión de la CRT a un péptido *in vitro*, utilizada como tratamiento en modelos animales de VPH, puede despertar una respuesta péptido específica de los linfocitos T CD8+, dirigiendo a una respuesta antitumoral. Previos estudios han empleado calreticulina unida a un antígeno del VPH-16 que puede ser E7 o E6, y han observado un importante efecto antitumoral¹⁹⁻²⁴.

Existen reportes en donde se señala que la CRT además de la función antes mencionada, tiene un efecto antiangiogénico, lo que provoca una deficiencia en el aporte de nutrientes que conlleva a un pobre desarrollo tumoral, y de allí su importancia como agente antitumoral^{22,64}.

Previos estudios han empleado calreticulina unida a un antígeno del VPH-16 que puede ser E7 o E6, y han observado un importante efecto antitumoral²¹⁻²⁴

2.4. Vacunas

Con el objeto de mejorar el tratamiento de las distintas formas de expresión de la infección por el VPH, se están investigando nuevas terapias, como la terapia fotodinámica, las terapias génicas y el desarrollo de nuevos medicamentos inmunomoduladores derivados del imiquimod. El principal objetivo es el desarrollo de vacunas que sean eficaces y eficientes contra el VPH, pero esto se ve limitado debido a las dificultades para cultivar este virus aunado a la falta de un modelo animal adecuado para su estudio, la especificidad de especie de estos virus y la necesidad que tiene de transcribirse y replicarse en queratinocitos diferenciados⁴⁴.

Existen dos tipos de vacunas las profilácticas y las terapéuticas. Las primeras deben ser aplicadas antes de la infección con la finalidad de producir anticuerpos neutralizantes contra el VPH para prevenir la infección, así como el desarrollo de lesiones en individuos infectados por el virus, mientras que las segundas se utilizan en los estados subsecuentes a la infección, para evitar la replicación del virus, o bien, para controlar el crecimiento tumoral cuando el VPH está integrado⁶⁵.

Las vacunas profilácticas están dirigidas a producir anticuerpos neutralizantes contra proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral de VPH. El uso de proteínas de fusión L1 y L2, que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, ha demostrado prevenir infecciones contra el VPH. Otra estrategia para producir respuesta inmune neutralizante contra las proteínas de la cápside viral ha sido la producción por ingeniería genética de proteínas ensambladas incapaces de infectar por si mismas a una célula viva conocidas como partículas parecidas al virus del papiloma (“VLPs” por sus siglas en inglés). Estas VLPs están compuestas solamente de las proteínas externas de membrana L1 o L1/L2. Las VLPs semejan viriones reales desde el punto de vista de su estructura y de su morfología, pero con la ventaja de que no contienen ADN viral, no son infectantes y no inducen transformación. Los vectores de expresión utilizados para este tipo de vacunas incluyen células de insectos, levaduras y bacterias.

Las vacunas terapéuticas inducen inmunidad celular específica que reconocen y atacan las células infectadas por el virus que expresan los antígenos virales en la superficie, permitiendo la regresión de tumores malignos. Para este tipo de diseño de vacuna se utilizan las proteínas E6 y E7 ya que estas son constantemente expresadas en las células

cancerígenas. Las vacunas terapéuticas que se han utilizado, han sido basadas en péptidos, en proteínas, vectores virales, vacunas de ADN y vacunas basadas en células^{44,66}. Brevemente se describen a continuación cada una de ellas.

A) Vacunas basadas en péptidos. Los péptidos utilizados en estas vacunas son sintetizados a partir de determinadas secuencias de proteínas virales. Estos péptidos actúan como antígenos que se unen a las moléculas del MHC y activan los receptores de las células T. Las proteínas virales que se han utilizado para este diseño de vacuna corresponden básicamente a E6 y E7. Los péptidos derivados de estas proteínas se han ligado a moléculas del MHC-I y específicamente al alelo HLA-A*0201.21. Los inconvenientes o dificultades de esta técnica son la baja inmunogenicidad del péptido, la restricción de las moléculas de MHC y la necesidad de definir epítopes para los CTL. Se han sugerido soluciones a estas dificultades tales como el aumento del tamaño del péptido, la adición de moléculas coestimuladoras o la utilización de un ayudante poderoso⁴⁴.

B) Vacunas basadas en proteínas. Estas vacunas utilizan como el nombre lo dice, proteínas completas que incluyan todos los epítopes posibles y potencialmente inmunogénicos para cada haplotipo de MHC. En este diseño, las células presentadoras de antígenos o los macrófagos capturan el antígeno y lo desdoblan en péptidos que son cargados en las moléculas MHC-I y MHC-II, a diferencia de las basadas en péptidos en donde estas son intercambiadas en la superficie de células presentadoras de antígenos con péptidos endógenos. Estas vacunas de proteínas purificadas inducirían tanto la producción de anticuerpos como una respuesta inmune de células Th y de CTL.

C) Vacunas basadas en vectores virales. Para el desarrollo de este tipo de vacunas se construyen vectores virales que portan genes virales específicos (E6 y/o E7). Estos vectores son utilizados como vehículos de transporte de antígeno viral hacia el interior de la célula blanco para estimular a los CTL contra antígenos virales específicos. De esta manera, el antígeno es procesado y presentado por moléculas del MHC-1 induciendo tanto la producción de anticuerpos como la producción de células T y la activación de CTL. Se han utilizado virus como la *Vaccinia* y los Adenovirus. Estos tipos de vacunas no debe emplearse en pacientes inmunosuprimidos, ya que requieren ser administrados en varias ocasiones (como refuerzo inmunológico), la respuesta inmunológica humoral y celular desencadenada por el reconocimiento de proteínas derivadas de los adenovirus o del virus de la vaccinia limitarían su administración múltiple⁴⁴.

D) Vacunas basadas en ADN. Las vacunas de ADN corresponden al uso de ADN desnudo en plásmidos, el cual es inyectado, por vía intramuscular, intradérmica o intravenosa, que permite la captura por las células presentadoras de antígenos como una expresión antigénica sostenida. Lo anterior aumenta la eficiencia de la activación de las células T y promueve el acceso del antígeno hacia la vía del procesamiento de las moléculas MHC-I⁴⁴.

E) Vacunas basadas en células. En este tipo de vacunas se manipulan las células presentadoras de antígenos de tal forma que son cargadas con proteínas, péptidos o ADN de antígenos tumorales conocidos (E6 y E7). Otra estrategia es la manipulación genética de células tumorales aisladas del paciente. Dichas células se transfectan con genes de citocinas inmunoestimuladoras o moléculas co-estimuladoras y posteriormente se reintroducen al

paciente, con el fin de producir una respuesta inmune antitumoral⁴⁴. Otro método innovador es la utilización de células procariotas (bacterias) que sirvan como vehículo para liberar el antígeno E7 y así producir una respuesta inmune contra el HPV-16, en general se utilizan bacterias seguras para el organismo como *Lactococcus lactis* o *Streptococcus gordonii*⁶⁷⁻⁶⁹.

2.4.1. Adenovirus

Al diseñar una vacuna, hay que tener en cuenta el modo de presentar el antígeno, ya que esto es un factor determinante para su efectividad. Actualmente los adenovirus son vectores ampliamente usados para expresar proteínas recombinantes.

Los vectores adenovirales son virus sin envoltura y con ADN de doble cadena que han sido empleados extensamente en la terapia génica, tratamiento del cáncer y enfermedades genéticas.

Estos vectores son construcciones artificiales en las que se realizan modificaciones en el genoma viral, mediante el reemplazo de algunos segmentos con DNA de una fuente diferente. Estas modificaciones permiten entre otras cosas, desactivar la capacidad de replicación e infección del virus y la clonación de genes heterólogos (E6 y E7). El resto de las propiedades genéticas, estructurales y funcionales del virus quedan conservadas. En estos vectores adenovirales se pueden clonar fragmentos de DNA de hasta 7.5 kb, se obtienen altos títulos de replicación, pueden infectar un amplio rango de células y tejidos de

mamíferos y estos adenovirus en terapia génica se mantienen en forma episomal con lo cual se reduce la mutagénesis insercional y las consecuencias inherentes a ello⁷⁰⁻⁷¹.

Los adenovirus son deficientes en replicación y requieren de un sistema de complementación que es la línea celular HEK293 (human embryonic kidney 293) modificada para que produzca constitutivamente los elementos E1 virales, que son suprimidos en el vector adenoviral⁷⁰⁻⁷¹.

Aunque existen otros tipos de virus que se han estado empleando para tratamientos clínicos (retrovirus, poxvirus, virus adeno-asociados y herpes), los adenovirus presentan ciertas ventajas que determinan su selección para emplearlos en la producción de vacunas. Los adenovirus presentan una menor patogenicidad, además pueden transducir células con gran número de partículas virales, un extenso rango de infección en diferentes tipos de células tanto en reposo como en división con una alta eficiencia y no se integra a los cromosomas⁷⁰⁻⁷¹.

Todas estas características hacen del adenovirus recombinante un eficiente vehículo de liberación génica y excelente herramienta de investigación; aunque también tiene la desventaja de que expresan varias proteínas virales que produce una respuesta inmune del organismo. Debido a lo anteriormente descrito, más de una transducción no es recomendable a menos de que la exposición inicial esté acompañada de una modulación inmunológica para suprimir la respuesta inicial a las proteínas de la cápsula adenoviral para que no se produzca una inactivación del vector y que puede causar inflamación o daño del tejido⁷⁰⁻⁷¹.

2.4.2 *Lactococcus lactis*

Otros microorganismos utilizados como vectores son las bacterias probióticas como lo es *Lactococcus lactis*. Esta bacteria ácido láctica se ha estudiado extensamente y ha sido manipulada para la producción de proteínas heterólogas²⁵⁻²⁸. El uso de *L. lactis* para producir y secretar proteínas heterólogas presenta grandes ventajas comparado a las que actualmente se manejan (por ejemplo *E. coli* y cepas atenuadas de *Salmonella* y *Mycobacterium*).

Lactococcus lactis es una bacteria ácido-láctica gram positiva y que por no ser patógena es ampliamente utilizado en la elaboración de alimentos fermentados, además de que algunas especies exhiben efectos pro-bióticos en humanos además de ser considerados microorganismos grado GRAS (por sus siglas en inglés “generally recognized as safe”)²⁹⁻³¹. *L. lactis* es una bacteria no colonizante del tracto digestivo^{28,32}, lo cual disminuye el riesgo de obtener una tolerancia al antígeno como sucede con otras bacterias, y además de que por si sola funciona como coadyuvante. Los datos experimentales y análisis genómico indican que solo unas pocas proteínas son naturalmente secretadas por *L. Lactis*, por lo tanto se aumenta el interés en el uso potencial de ésta en experimentos de secreción de proteínas de interés biotecnológico. Por lo tanto *L. Lactis* ha sido extensamente manipulada para la producción y exportación de proteínas heterólogas con alto valor antigénico o enzimático. El anclaje de proteínas a la superficie celular de *L. lactis* o la secreción proteica al medio, son de gran interés para un gran número de aplicaciones biotecnológicas⁷².

En la actualidad se han publicado trabajos en donde se produce y secreta la proteína E7 del HPV-16 en dicha bacteria para estimular una respuesta inmune específica contra E7 en modelos murinos^{33,69,73}.

Otra ventaja importante, es que la producción de este microorganismo es sencilla, rápida y económica por lo que lo hace una herramienta ideal en la elaboración de vacunas que se puedan utilizar en la población en general.

2.5. Modelo animal para el Cáncer cérvico uterino

El VPH debido a sus particularidades biológicas para infectar células humanas, hace que los establecimientos de modelos celulares y animales sean muy difíciles. La estrategia que se a seguido para la implementación de los modelos que se utilizan en la actualidad, es el uso de la línea celular tumoral TC-1 que son células de epitelio de pulmón de la cepa de ratones singénicos C57BL/6 que han sido transformadas *in vitro* con los oncogenes E6 y E7 del VPH-16 y ras.

Capítulo 3

3.1. JUSTIFICACIÓN

El CaCu representa uno de los problemas más graves de salud pública a escala mundial y se considera como la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer alrededor del mundo. En México, se ha presentado como el cáncer más frecuente en la población femenina en la última década y es considerado como la primera causa de muerte por neoplasias en la mujer¹. Más del 90% de los tumores de CaCu está asociado a HPV por lo que el control de la infección de este virus es de suma importancia. En el presente trabajo desarrollamos un tratamiento antitumoral basado en el desarrollo de una respuesta inmune mediante la expresión del antígeno E7 del HPV, el cual ya está demostrado que induce una respuesta inmune celular.

Nuestro trabajo se basó en dos sistemas importantes: en el primero utilizamos un vector adenoviral que expresa la fusión del antígeno E7 a la proteína calreticulina, la cual es muy prometedora contra el desarrollo de tumores que expresan E7. El segundo se basó en un sistema inocuo para la presentación del antígeno E7 como lo es el uso de bacterias lácticas. Este sistema día a día pone de manifiesto la capacidad de *Lactococcus lactis* para la expresión y entrega de antígenos con el resultado de la inducción de una respuesta inmune. Además, como es un vector de producción segura, sencilla, rápida y económica, lo convierte en una estrategia muy conveniente para este tipo de inmunización.

Hasta la fecha no se ha reportado un tratamiento combinado, donde se utilice una preinmunización con una bacteria láctica recombinante para mejorar la respuesta dada por un tratamiento adenoviral. Es por esto, que nuestro trabajo es original e innovador.

Nuestros resultados marcan la pauta para su aplicación en humanos, en donde al extrapolarlos, se inmunizaría a la población con el lactococcus recombinante y cuando se presentase el tumor se reinmunizaría con el adenovirus directamente al tumor.

3.2. HIPOTESIS

El adenovirus que expresa E7 fusionado a calreticulina posee una mayor actividad antitumoral que el que expresa únicamente E7 y este efecto se potencia con la preinmunización de un *L. lactis* que expresa el antígeno E7.

3.3.OBJETIVO

Determinar si el adenovirus que expresa E7 fusionado a calreticulina posee una mayor actividad antitumoral que el que expresa E7, y si este efecto se potencia con la preinmunización de un *L. lactis* que expresa el antígeno E7.

3.3.1. Objetivos específicos

1. Determinar si un adenovirus que exprese E7 fusionado a calreticulina posee un mayor efecto antitumoral que otro que exprese únicamente E7.
2. Analizar si la inmunización con *Lactococcus lactis* que expresa la oncoproteína E7 del VPH mejora el efecto antitumoral del tratamiento con los adenovirus que expresan E7 y calreticulina/E7.
3. Determinar si el efecto antitumoral de los diferentes tratamientos inducen una respuesta inmune celular.

Capítulo 4

MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Ratones y Líneas Celulares

Ratones C57BL/6 hembras de entre 6 a 8 semanas de edad fueron obtenidos del Laboratorio Harlan (Fig. 5). La línea celular tumoral TC-1 fue proporcionada por el Dr. Augusto Rojas del Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL (Fig. 6). Esta línea celular fue crecida en medio DMEM suplementada con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado por calor y 100 U/ml de penicilina-streptomina. Las líneas bacterianas fueron *L. lactis* NZ9000 (*L.lactis*) crecida en medio M17 (Difco) suplementado con 1% de glucosa y *L. lactis* E7 (*L.lactis*-E7) para el cual se utilizó el mismo medio solo que con 10µg/ml de Cloranfenicol (CM) y 10ng/ml de Nisina para la inducción del antígeno E7.



Figura 5. Ratón de la cepa C57BL/6

ATCC Number: **CRL-2785**
Designation: **TC-1**

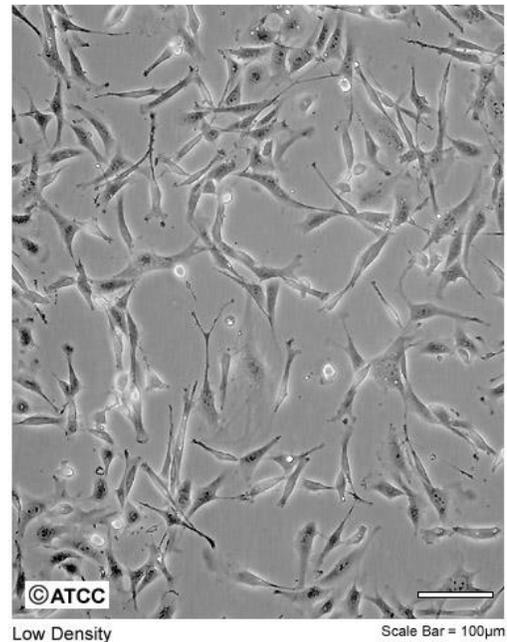


Figura 6. Línea celular TC-1

4.2. Vectores adenovirales.

Se utilizaron cuatro vectores adenovirales recombinantes deficientes de replicación. Los adenovirus que expresan LacZ (Ad-LacZ), IL-2 (Ad-IL2) y E7 (Ad-E7) del VPH-16 fueron proporcionados por el Dr. Augusto Rojas y el adenovirus que expresa la fusión calreticulina/E7 (Ad-CRT/E7) fue construido previamente en nuestro laboratorio (Fig 7).

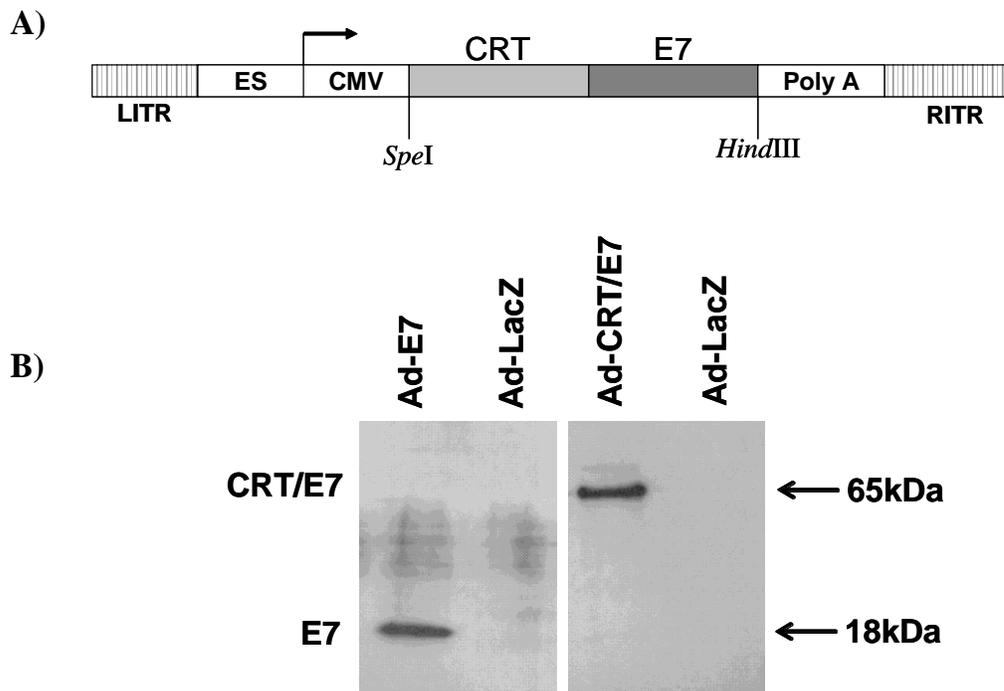


Figura 7. Casete de Expresión para la CRT/E7 en el Adenovirus y detección de E7 y CRT/E7 mediante Western Blot. (A) Esquema del casete de expresión de la CRT/E7 bajo la regulación del promotor (CMV), conteniendo además, una señal de encapsidación (ES), secuencia de poliadenilación (Poly A), secuencias repetidas terminales invertidas izquierda y derecha (LITR o RITR respectivamente). (B) Western blot mostrando la expresión de E7 y CRT/E7 en la línea celular de cáncer de pulmón A549 infectada a un MOI de 100. El Ad-LacZ sirvió como control negativo. E7 se detectó usando un anticuerpo anti-E7 del VPH de ratón como una proteína de 18 kDa y la CRT/E7 como una proteína de 64kDa.

4.3. Preparación de células bacterianas

A cultivos de *L. lactis* E7 de 50 ml previamente inducidos con Nisina en medio M17/Glucosa1%/CM se les tomó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm para calcular el número de unidades formadoras de colonias (UFC) con la fórmula $DO \times 5 \times 10^8 = \text{UFC/ml}$. Después se centrifugó el cultivo y la pastilla se lavó 3 veces con buffer fosfato salino (PBS 1X) y se resuspendió en un volumen exacto de PBS para tener una concentración de 1×10^9 UFC en 10 μl .

4.4. Preparación de los vectores adenovirales.

Para la producción a gran escala de un vector adenoviral se requiere la preamplificación con una producción a pequeña escala. El objetivo de esta técnica es contar con un mínimo de partículas virales para que en un corto tiempo se pueda lograr la cosecha del vector.

Las **preamplificaciones** y producciones virales se llevan a cabo en la línea celular HEK-293. La línea celular HEK-293 son células de riñón embrionarias humanas. Estas células están transformadas con los genes tempranos del adenovirus E1A y E3A, de este modo se complementa la carencia de los genes tempranos en los adenovirus recombinantes y pueden formarse las partículas virales. Estas son liberadas al medio de cultivo por lisis celular (efecto citopático) (“CPE” por sus siglas en inglés).

4.4.1. Producción adenoviral

En primer lugar, en una campana de flujo laminar se introducen los materiales de trabajo como pipetas serológicas de volúmenes variables, pipetor, gradillas de tubos de 15 y 50 ml, tubos Falcon de 50 y 15 ml, bote de desechos con cloro al 3%, parafilm y pipetas Pasteur. Posteriormente se prende la luz UV por lo menos 15 minutos y el medio DMEM adicionado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) se calienta en baño maría a 37° C.

4.4.1.1. Preamplificación del adenovirus

Previamente, se obtuvo un frasco T-75 para cultivo con una confluencia del 70% con células HEK-293.

A 5 ml de medio DMEM/ SFB 10%, se le adicionaron 50 µl del virus (ya sea en lisado crudo o purificado) y se mezclaron para asegurar su homogeneidad. Este medio con virus se colocó como cambio de medio en el frasco a transducir, agregándose lentamente por las paredes del frasco. Se incubó a 37°C por dos horas ladeando el frasco cada 15 minutos. Posterior a esta incubación se adicionaron otros 5 ml de medio DMEM con SFB y se incubó hasta observar el efecto citopático como a los 3 días aproximadamente. Y se cosechó cuando se observó un 50% de células despegadas.

El producto a **cosechar** se transfirió en tubos Falcon de 50 ml utilizando una pipeta de 10 ml. Para despegar completamente las células, se utilizó el mismo medio del frasco, vertiéndolo encima de las células hasta lograr su separación. Se centrifugó el producto por

10 minutos a 2000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante hasta dejar 2 ml de medio para resuspender la pastilla de células. Se almacenó a -70°C.

El producto de la cosecha se descongeló en baño a 37°. Se realizaron dos congelaciones y descongelaciones más a las mismas condiciones. Finalmente se centrifugó por 5 min a 3000 rpm y se tomó el sobrenadante. A este sobrenadante se le llamó **lisado crudo** y se almacenó a -70°C.

4.4.1.2 Producción a gran escala del adenovirus.

Para la **producción a gran escala** se utilizaron 15 platos de 150 ml conteniendo un cultivo de células HEK-293 con una confluencia del 100%. Se homogenizó todo el lisado crudo obtenido de la producción a pequeña escala en 105 ml de medio DMEM/ SFB 10% fresco. Este homogenizado de medio y virus se utilizó como cambio de medio para las 15 placas conteniendo el cultivo celular. Primeramente se desechó el medio viejo que contenían y se les añadieron 7 ml de medio con el virus, se incuban durante 2 horas ladeando los platos cada 15 minutos. Se completó a 20ml de medio por plato y se incubó hasta observar el efecto citopático y punto de cosecha. La cosecha y la formación del lisado crudo se realizaron de la misma forma antes descrita.

4.4.1.3. Purificación de vectores adenovirales.

Dentro de la campana de flujo laminar, se colocó en tubos de polialómero (Beckman 14x89mm) 2.4 ml de CsCl densidad 1.4 g/ml + 2.4 ml de CsCl densidad de 1.2 g/ml (este último gota a gota por las paredes) a esto se le llama **gradiente discontinuo**. Se agregó el lisado crudo lentamente por las paredes. Se tapó con aceite mineral, procurando llegar al borde del tubo. Se calibró el peso de los tubos a una diferencia no mayor de 0.01g, se metieron en la camisa y se atornilló. Se colocaron en el rotor SW 41. Se establecieron las condiciones de corrida en la ultracentrífuga Beckman a 35,000 rpm a 4°C por 1 hr y 20 min. Se llevó el rotor al área de cultivo y se manejaron los tubos dentro de la campana para la recuperación de la primer banda viral que aparece en el punto de cambio de densidad (suelen aparecer dos). La banda inferior corresponde a las partículas infecciosas, la superior a las partículas defectuosas. La banda inferior se recuperó con pipetas Pasteur estéril y bulbo, quitando la capa de aceite primero y después se aspiró la banda evitando tomar cloruro de cesio en exceso. Se colocó en un tubo estéril de 5 ml.

Se prepararon nuevamente tubos de polialómero con 9.3 ml de **CsCl a una densidad de 1.35 g/ml** cada uno, se agregó lentamente la banda recuperada del gradiente discontinuo (1.5 ml máximo por tubo) y se tapó con aceite mineral estéril y se calibraron. Se centrifugaron a 35000 rpm a 4° por 18 hrs, luego se sacaron los tubos con cuidado para no perturbar la banda y se trabajaron dentro de la campana. Se recuperó la banda inferior con pipeta Pasteur y bulbo quitando la capa de aceite primero. La banda recuperada se colocó en un tubo de 5 ml estéril.

Se procedió a la **diálisis** para retirar los restos de CsCl, para lo cual se preparó 1.5 L del buffer I (Tris pH 7.8 10mM, NaCl 140mM, MgCl₂ 1mM). Se humedecieron los casetes *Slide a Lyser* en este buffer por 3 min. Se retiró del buffer y se verifica que no tenga fugas la membrana. Se aspiró la banda viral con una jeringa y aguja (22G) estériles y se introdujo el virus por uno de los orificios señalados en el casete. Se aspiró el aire necesario para que la suspensión viral aparezca uniforme dentro de la membrana. Se colocó dentro del buffer I y se dializó con agitación continua moderada por una hora en cuarto frío (4°C). Se cambió el buffer de diálisis una vez y se dializó por una hora más. Posteriormente se cambió el buffer 1 por un buffer de diálisis II (Tris pH 7.8 10mM, NaCl 140mM, MgCl₂ 1mM, Glicerol 10%) y se dializó 1 hora en agitación suave a 4°.

Terminada la diálisis se recuperó la banda desalada del casete con una jeringa de 10ml, primero se introduce aire para poder succionar toda la banda y se colocó en un tubo estéril de 5 ml. Se hicieron alícuotas de 50 μ l y se colocaron en crioviales de 2 ml y se almacenaron a -70°.

A todos los vectores adenovirales se les calculó el **título de partículas virales**. Se descongeló una alícuota del virus (100 μ l) a 4° y se prepararon dos diluciones; la # 1 con 52 μ l de buffer de lisis (SDS 0.1%, Tris- HCl pH 7.4 10mM, EDTA 1mM) + 52 μ l del virus, y la #2 utilizando 168 μ l de buffer de lisis + 42 μ l del virus. Para los blancos se utilizó el buffer de diálisis II. Se incubaron las muestras a 56° por 10 min, con la dilución #1 se preparó la dilución #3 haciendo una dilución 1:5, la dilución #2 se diluyó 1:5 y 1:10 para preparar las diluciones # 4 y #5 respectivamente. Se leyeron al espectrofotómetro las

diluciones #3, #4 y #5 (2 veces) a 260 nm. Para determinar el título del vector en cada dilución, se multiplicó la absorbancia por el factor de dilución y el coeficiente de extinción: $(DO_{260})(\text{dilución del virus})(\text{dilución de la cubeta})(1.1 \times 10^{12}) = \text{PV/mL}$. El promedio de las cuatro lecturas correspondió a la concentración de virus en PV/mL.

Las soluciones virales fueron resuspendidos en un volumen exacto de PBS para tener la dosis de 5×10^{10} PV/ml in 20 μ l.

4.5. Detección de la expresión de E7 en *Lactococcus lactis*.

Para determinar si el *Lactococcus lactis* expresaba y secretaba las proteínas E7, se analizaron las muestras del sobrenadante de los medios de cultivo con crecimiento de las cepas recombinantes, por inmunoblot utilizando anticuerpos específicos para ambas proteínas.

Preparación de extractos proteínicos. Se obtuvo un cultivo de 2 ml a una $DO_{600}=0.6$, se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 5 minutos; la fracción del sobrenadante así como la fracción celular se procesaron por separado para un análisis por Western Blot.

Western Blot.

SDS-PAGE. Se preparó el gel resolutivo a una concentración del 12% y posteriormente el gel concentrador. Las muestras se calentaron a 99°C por 3 minutos antes de cargar en el gel.

Transferencia. Se lavó el gel resolutivo en buffer de transferencia (Tris Base 50mM, Glicina 380mM, Metanol 20%, SDS 0.01%). Se preparó la membrana PVDF colocándola en metanol y posteriormente en agua. Se colocó adecuadamente papel filtro-membrana-gel resolutivo-papel filtro y se realizó una transferencia en “semi-seco” durante una hora utilizando el “Trans-blot” de Biorad.

Bloqueo. Se colocó la membrana de transferencia en solución de TBS (Tris 20mM pH7.5, NaCl 137mM, Tween 0.5%) y 10% de leche. Se bloqueó toda la noche a temperatura ambiente.

Incubación con Anticuerpos. Se lavó la membrana en TBS y después se colocó en una solución con el primer anticuerpo en una solución de TBS y 2% de leche; se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron nuevos lavados con TBS; y se incubó con proteína G unido a fosfatasa alcalina y finalmente se reveló con CDP Star.

Revelado. El segundo anticuerpo se encuentra unido al sustrato de la fosfatasa alcalina, la cual en presencia del revelador emitió una señal que fue captada en un film fotosensible.

4.6. Inmunización intranasal de los ratones con *Lactococcus lactis* que expresa E7 del HPV-16

Se inmunizaron ratones de la cepa C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, con 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactococcus lactis* que expresa E7. La administración intranasal de *Lactococcus* se realizó en 10 μ l con una micropipeta por las fosas nasales de los ratones en tres dosis a los días 0, 14 y 28 días para inducir una respuesta inmune contra la oncoproteína E7. (Fig. 8).



Figura 8. Inmunización intranasal.

Para preparar la dosis, la noche previa se hizo un preinóculo con 50 μ l de glicerol stock de *Lactococcus lactis* en 5 ml de medio M17/Glucosa 1%/CM 10ng/ml y se incubó toda la noche a 30°C. Al día siguiente se pasó el preinóculo a un volumen mayor de medio (dependiendo del número de ratones que se inmunizaron), se dejó incubando hasta que las bacterias alcanzaron una densidad óptica de entre 0.6 a 0.8, enseguida se procedió a inducir con nisina el cultivo a una concentración final de 10ng/ml por 3 horas. Posteriormente se

midió la densidad óptica alcanzada y se calculó el número de UFC/ml multiplicando la densidad obtenida por 5 y esto por 10^8 (D.O. X 5×10^8). Este resultado se multiplicó por el volumen con el que se trabajó para obtener el número total de UFC. Enseguida se procedió a obtener la pastilla celular, centrifugando a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos. La pastilla se lavó 2 veces con PBS y se resuspendió en el volumen exacto de PBS para aplicar la dosis requerida en el ratón. Se debe agilizar el proceso de la obtención de las bacterias y el manejo en hielo para asegurar el buen estado de estas al ser utilizadas para el siguiente paso de inmunización de los ratones.

4.7. Inducción Tumoral en los ratones C57BL/6

Las células TC-1 utilizadas para generar el modelo tumoral murino son células tumorales que expresan el E7 del HPV-16. Estas células se cultivaron *in-vitro* en medio DMEM/Suero fetal bovino 10% a 37°C , 5% CO_2 y 100% de humedad. Para la implantación en el modelo animal, se colectaron las células lavando con PBS y aplicando tripsina al 0.25%. Se cosecharon en un tubo de 50 ml con medio/SFB10%, se contó el número de células en la cámara de Neubauer y se calculó el número total en base al volumen final. Se centrifugaron a 3000rpm a 4°C por 10 minutos y el botón celular se resuspendió en un volumen adecuado de PBS para aplicar la dosis correcta.

El implante de las células tumorales en las ratones se realizó de forma subcutánea en la pierna derecha con una dosis de 1×10^5 células en un volumen de 100 μL con una jeringa de tuberculina con aguja de 29G (Fig. 9).

Se monitoreó el desarrollo tumoral diariamente para localizar a los ratones con un tamaño aproximado de entre 5 a 7 mm para empezar con el tratamiento terapéutico.

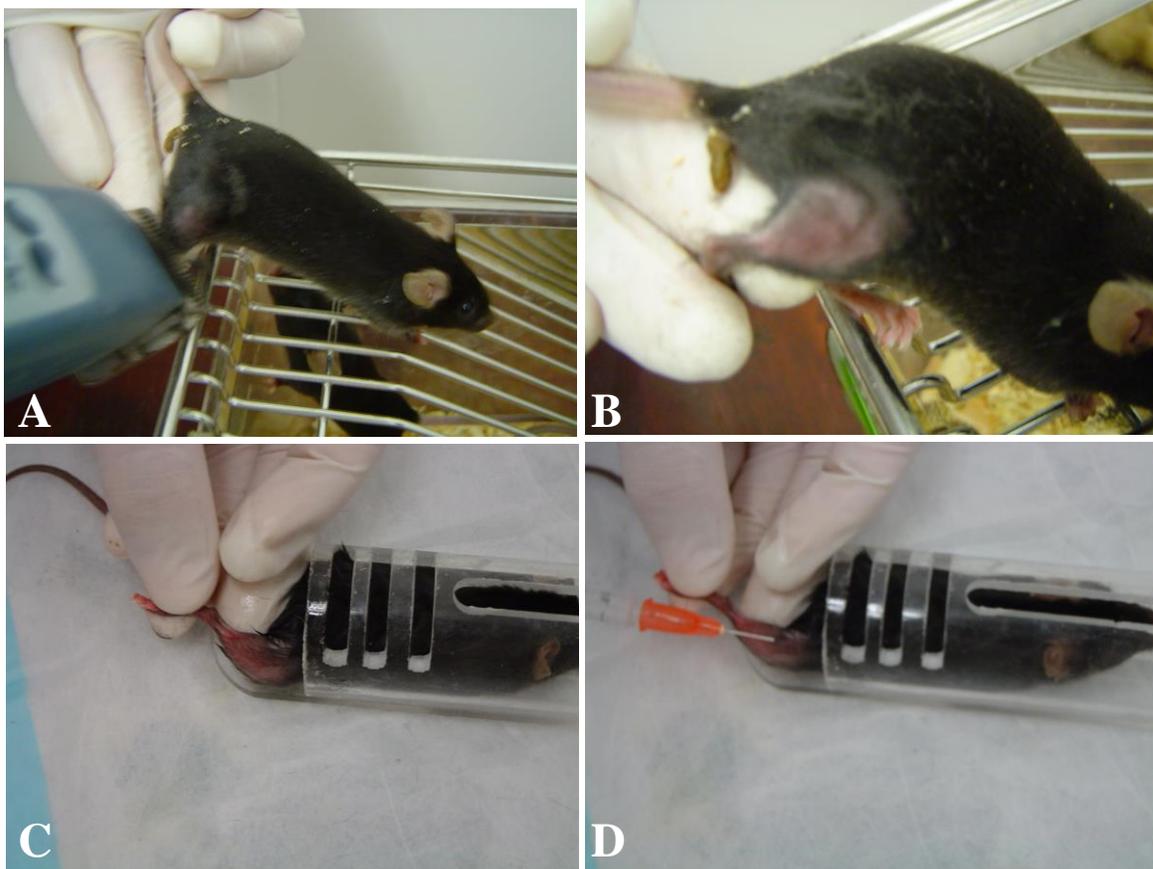


Figura 9. Implante de células TC-1. **A**, Depilación de la zona. **B**, Zona depilada. **C**, Manipulación de un ratón con un inmovilizador de acrílico. **D**, Inyección de las células TC-1 de forma subcutánea en la pierna derecha del ratón.

4.8. Tratamiento Terapéutico con los vectores Adenovirales que expresan E7, E7/CRT e IL-2.

Una vez que los ratones desarrollaron el tumor se procedió al tratamiento terapéutico con el vector adenoviral que expresa el gen de interés. Este vector se administró

con la inyección de 20 μ l de la dilución correcta de los vectores directamente en el tumor con una jeringa Hamilton con aguja de 29G, como se observa en la figura 10. El tamaño del tumor inicial se anotó y se marcó el ratón en la oreja para identificarlo y poder realizar el monitoreo del crecimiento tumoral.

Se utilizaron grupos de ratones necesarios con diferentes tratamientos dependiendo de los objetivos.

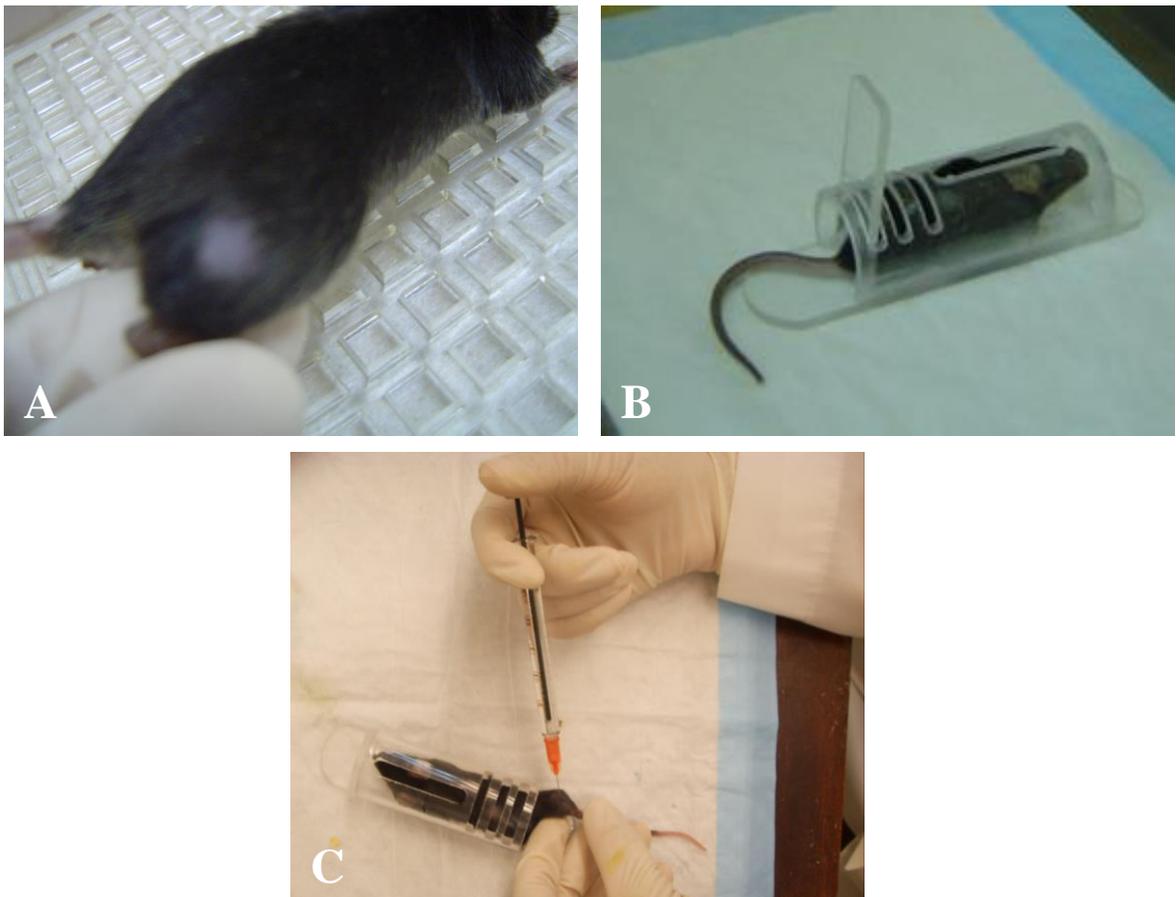


Figura 10. Aplicación del tratamiento terapéutico. A, Tumor ya establecido. **B,** Inmovilización del ratón. **C,** Aplicación de la dosis del vector adenoviral.

4.9. Tratamiento combinado profiláctico y terapéutico

La dosis antes mencionada de *L. lactis* E7 y *L. lactis* NZ9000 (silvestre) se aplicó en las mismas condiciones descritas anteriormente; una semana después de la última inmunización, los ratones fueron inyectados subcutáneamente en la pierna derecha con 100 μ l de PBS conteniendo 1×10^5 células TC-1. Posteriormente los ratones se monitorearon constantemente hasta que el diámetro del tumor establecido oscilaba alrededor de los 6 mm, para proceder a la aplicación intratumoral de 5×10^{10} PV/ml en 20 μ l del vector adenoviral. Las dimensiones de los tumores fueron medidas cada tercer día en dos direcciones perpendiculares con un calibrador Vernier y el volumen de los tumores fue estimado por la fórmula de un elipsoide $(SD^2)(LD)(0.5236)$ en donde SD es el diámetro menor y LD es el diámetro mayor. También se monitoreó la supervivencia de los ratones hasta el día de su muerte o sacrificio cuando los tumores superaban los 2 cm de diámetro.

4.10. Evaluación del Crecimiento Tumoral

Para evaluar el crecimiento de los tumores fue necesario sacar el promedio de los diámetros día por día, sumando el diámetro menor mas el diámetro mayor entre dos ($DP = [D_{menor} + D_{mayor}] / 2$). Los datos recolectados en cada observación ($DP_{día\ x}$) se dividieron por el valor de DP al día de la transducción ($DP_{día\ 0}$) y se multiplicaron por 100 para obtener el índice de crecimiento relativo o ICR ($ICR = [DP_{día\ x} / DP_{día\ 0}] \times 100$). Los valores de ICR de cada tumor por día se promediaron para cada grupo de tratamiento y se determinaron los errores estándares.

Para los estudios de eficacia antineoplásica se agruparon y promediaron los ICR de los animales que pertenecen a los grupos tratados con los vectores adenovirales y sus

controles. A este ICR se le resta 100 para obtener la proporción neta de crecimiento tumoral (PNCT) en cada punto de la observación y se determinan los promedios y errores estándares. Con estos datos se construyó una curva de crecimiento para determinar la eficacia de los tratamientos y poder ver si existía una regresión tumoral o disminución del volumen tumoral.

4.11. Análisis de Supervivencia.

Para llevar a cabo el análisis de supervivencia, se registró el tiempo de vida de los ratones utilizados en este estudio. Registrándose la causa de muerte ya sea porque fueron sacrificados debido a que el tamaño rebasó 25 mm o por la fuerte agresividad del tumor. Con los datos de supervivencia de cada animal se construyó una curva de Kaplan Meier para analizar la eficacia de la terapia para prolongar la supervivencia de los ratones.

4.12. Sacrificio y obtención de tejidos.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. La obtención de los tejidos (bazo y tumor) se realizó en condiciones de absoluta esterilidad, dentro de una campana de flujo laminar. El tumor se fijó con paraformaldehído al 4% (PFA). El bazo se colocó en medio DMEM con SFB10%, se disgregó con el émbolo de una jeringa y una malla de acero inoxidable estériles para homogenizar las células del bazo y posteriormente se pasaron a través de un filtro de 30 μ m para individualizar las células. Posteriormente se realizó un conteo celular y viabilidad con el colorante azul de tripano y una cámara de Neubauer al microscopio.

4.13. Detección de IFN- γ

Diez millones de células de bazo (1×10^7) de los diferentes tratamientos fueron co-cultivadas con 1×10^6 células TC-1 tratadas previamente con mitomicina C ($30 \mu\text{g/ml}$ por 2 h) en placas de 6 pozos por 3 días. Posterior a la incubación se colectó el sobrenadante para determinar los niveles de IFN- γ mediante la utilización de un kit de ELISA para IFN- γ (R&D systems) de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor.

4.14. Análisis de citometría de flujo.

Con los linfocitos obtenidos del tejido esplénico se realizó un análisis de los tipos de células y su porcentaje. Para esta técnica es necesario separar 5×10^6 linfocitos en tubos corning de 5 ml para citómetro, se centrifuga a 1200 rpm a 4°C por 10 minutos, y se elimina el sobrenadante. El botón celular se lava una vez con PBS y se vuelve a centrifugar. A la pastilla celular se le aplican $10 \mu\text{l}$ de los anticuerpos fluorescentes anti-ratón CD4-FITC (para detectar linfocitos T cooperadores), CD8-APC (para detectar linfocitos T citotóxicos), CD49b-PE (para células NK) y un marcador de isotipos. Posteriormente se incuban en oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga para obtener el botón y finalmente se resuspende en 1 ml de PBS. Las células se analizaron con un citómetro de flujo para calcular la cantidad de cada una de las células en las muestras.

4.15. Preparación de las piezas de tumor para su análisis histológico.

De los ratones que fueron sacrificados previamente para obtener los linfocitos, a la par también se extrajo una porción del tumor y del bazo para ser procesados para su análisis histológico. Las piezas se colocaron en una caja petri con PBS y se cortaron de aproximadamente 8mm³ para cada órgano, la mitad de las piezas se colocaron en la solución fijadora de paraformaldehído al 4% (PFA), la otra mitad se congeló en Tissue Tek para su posterior uso.

Las piezas que se fijaron en PFA por 2 días, se procesaron para su inclusión en parafina, para lo cual, el primer paso fue su deshidratación por cambios graduales de etanoles de 1 hora en cada uno en el siguiente orden: PBS1X 2 veces, Etanol 30%, Etanol 50%, Etanol 70%, Etanol 96% y Etanol absoluto. Posteriormente se aclararon las piezas pasándolas a las siguientes soluciones también por 1 hora: Etanol:Xilol 1:1, Xilol y Xilol. Después se incluyeron en parafina líquida a 60°C con dos cambios de 1 hora cada uno, finalmente se colocaron las piezas en moldes de montaje, se les agregó parafina líquida y se dejaron enfriar hasta su soldificación.

Las piezas incluidas en parafina se cortaron en un microtomo con un grosor de 6 micrómetros y se colocaron en laminillas superfrost de corning y las piezas congeladas se cortaron en un criostato a un grosor de 10 micrómetros y se colocan en laminillas superfrost.

4.16. Análisis morfológico de los cortes de tumor.

Para el análisis morfológico se utilizó la tinción de Hematoxilina y Eosina (HE). Los cortes se desparafinaron e hidrataron para llevar a cabo una tinción de Hematoxilina y Eosina, para lo cual los cortes en parafina son hidratados pasándolos por: Xilol 5 min dos veces, Etanol absoluto 5 min dos veces, Etanol 50% 5 min, agua destilada 5 min por 2 veces, Hematoxilina 30 segundos, agua corriente 1 minuto, agua destilada 1 minuto, alcohol ácido 1 minuto, agua destilada 1 minuto, Eosina 3 inmersiones, lavado con agua corriente y agua destilada, etanol 96% 2 minutos, etanol absoluto 2 cambios de 2 minutos, etanol:xilol 1:1 2 minutos y 2 cambios de xilol de 2 minutos. Los cortes una vez deshidratados en xilol, se montaron con entellan y un cubreobjetos.

4.17. Evaluación de la inducción de apoptosis en los tumores.

Los cortes en parafina de los tumores de los diferentes tratamientos fueron desparafinados y rehidratados para su utilización en la técnica de TUNEL con un kit de detección de apoptosis (Trevigen) con el procedimiento recomendado por el proveedor. En el cual previamente se hizo un tratamiento con proteinasa K (1 μ l de PK en 50 μ l de H₂O desionizada) y se incubó por 30 minutos, posteriormente se lavaron las laminillas con H₂O desionizada y se sumergieron en solución bloqueadora por 5 minutos a temperatura ambiente (45 ml de metanol + 5 ml de H₂O₂ 30%), se lavaron con PBS y posteriormente se sumergieron en el buffer TdT 1X por 5 min, para posteriormente cubrir con 50 μ l de la mezcla de reacción de marcaje y se incubó por 90 min a 37° y cámara húmeda. Después se sumergieron en buffer stop TdT 1X por 5 min. a temperatura ambiente, se lavó con PBS, y después se colocó la solución strip HRP y se incubó 10 min a 37°, se lavó con PBS y se

sumergieron en solución DAB de 2 a 7 min. Se lavó con H₂O desionizada y se contratiñó con verde de metilo, se deshidrataron y se montaron con entellan y cubreobjetos.

4.18. Detección de linfocitos T CD8+ mediante inmunohistoquímica

Los cortes en parafina de los tumores de los diferentes tratamientos se desparafinaron y rehidrataron, después fueron bloqueados con suero de caballo al 1% en PBS por 1 hora, se lavaron con PBS y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo anti ratón CD8-FITC (Milteny). Posteriormente se lavó y se montó la laminilla con vectashield (Vector) y se analizaron en un microscopio confocal de fluorescencia (Leica TCS SP5) con sistema de captura y análisis de imágenes, lampara UV y Laser.

Capítulo 5

RESULTADOS

5.1. La Calreticulina incrementa dramáticamente el efecto antitumoral de un adenovirus que expresa E7.

Los tratamientos terapéuticos son de gran importancia debido a que la mayoría de las pacientes empiezan su tratamiento en estadios avanzados del cáncer cérvico uterino. Debido a esto, analizamos la eficacia antitumoral del Ad-CRT/E7 en ratones con tumores inducidos por la línea celular TC-1. Después de que los tumores alcanzaron un diámetro aproximado de 6 mm se administraron intratumoralmente una sola dosis de los diferentes adenovirus Ad-CRT/E7, Ad-E7 y Ad-IL2, así como sus respectivos controles Ad-LacZ y PBS. Se monitoreó el desarrollo del tumor en función del tiempo registrando el diámetro menor y el diámetro mayor para calcular el volumen tumoral mediante la fórmula de un elipsoide, y además se contabilizó la supervivencia. Los resultados se muestran en la Figura 11A en donde observamos que los grupos de ratones inmunizados con los adenovirus que expresan E7 e IL2 (Ad-E7 y Ad-IL2) el crecimiento tumoral fue constante a través del tiempo, con un volumen de 5000 a 6000 mm³ a los 28 días, y muy similar al que presentaron los grupos control tratados con Ad-LacZ y PBS. En contraste, el tratamiento con el Adenovirus que expresa E7 fusionada a calreticulina (Ad-CRT/E7) indujo una regresión tumoral total en el 46% de los ratones (6/13) y en el 54% restante (6/13) el desarrollo tumoral fue más lento, alcanzando en el mismo tiempo valores de 2000 mm³.

Al analizar el efecto de las inmunizaciones anteriores sobre la supervivencia de los ratones encontramos que en los grupos control (Ad-LacZ y PBS) y en el tratado con Ad-IL2 y Ad-E7, todos los ratones habían muerto para el día 70 posterior a la aplicación de los Adenovirus. En contraste para ese mismo día, en el grupo de ratones en donde se aplicó el tratamiento Ad-CRT/E7 encontramos 3 ratones vivos de los 13 utilizados (23%) los cuales se mantuvieron con vida al menos durante un período de 300 días (Fig. 11B).

5.2. La preinmunización intranasal con *Lactococcus lactis*-E7 potencia el efecto antitumoral de Ad-CRT/E7.

Una vez demostrado que el Ad-CRT/E7 es el que presenta un mayor efecto antitumoral nos abocamos a determinar si una preinmunización con bacterias lácticas expresando E7 en su superficie podría mejorar dicho efecto. Para esto diferentes grupos de ratones se inmunizaron intranasalmente con una cepa de *L. lactis* que expresa E7, posteriormente se dio el reto con las células tumorales TC-1 y finalmente se aplicó el Adenovirus correspondiente. En este experimento nuevamente se utilizaron como controles Ad-LacZ y PBS, y una cepa silvestre de *L. lactis* y se monitoreó el crecimiento tumoral y la supervivencia de los ratones. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

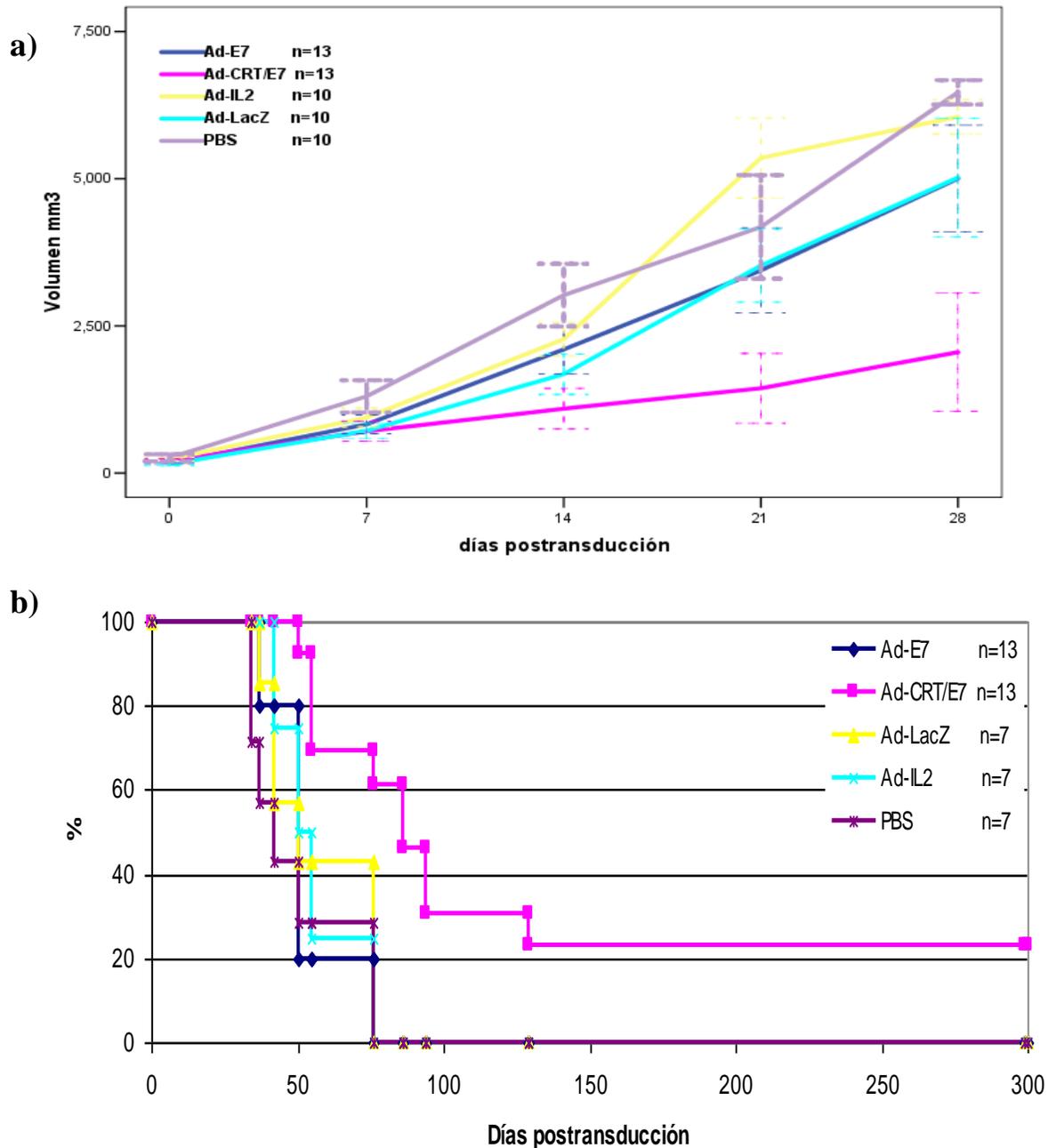


Figura 11. Análisis del efecto antitumoral de un Adenovirus que expresa calreticulina fusionada a E7. Cinco grupos de ratones fueron inoculados subcutáneamente en la pierna derecha con 5×10^4 células TC-1. Cuando los tumores tenían entre 6-7 mm de diámetro, se administró intratumoralmente los diferentes Adenovirus a una dosis de 5×10^{10} PV en 20 μ L. Adenovirus y tamaño del grupo (n): Ad-CRT/E7 (n=13), Ad-E7 (n=13), Ad-LacZ (n=7), Ad-IL2 (n=7) y PBS (n=7). **(A) Crecimiento tumoral en función del tiempo.** El crecimiento tumoral fue monitoreado cada tres días, se calculó el volumen mediante la fórmula de un elipsoide y se graficaron las medias de cada grupo. Las líneas verticales punteadas corresponden al error estándar de cada grupo. El tratamiento con Ad-CRT/E7 mostró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). **(B) Curva de supervivencia.** Se registró el porcentaje de ratones sobrevivientes por un periodo de 300 días.

En la Figura 12A observamos que el grupo de ratones tratados únicamente con PBS el crecimiento tumoral fue constante en función del tiempo alcanzando un volumen tumoral de 6200 mm³ a los 28 días. Este comportamiento fue muy similar para los grupos en donde se utilizaron los tratamientos combinados *L. lactis-E7* + Ad-E7 y *L. lactis* + Ad-LacZ. Nuevamente la mejor inhibición de desarrollo tumoral se observa en aquellos grupos en donde se utilizó el Adenovirus que expresa la fusión Calreticulina-E7 (Ad-CRT/E7), con la diferencia de que en el tratamiento donde se combinó con la cepa de *Lactococcus lactis* que expresa E7 se obtuvo una mejor inhibición del crecimiento tumoral que combinándolo con una cepa silvestre de *L. lactis*. observó un desarrollo tumoral homogéneo y constante en todos los ratones muy similar al que presentó el control PBS, a diferencia de los grupos de ratones en donde se utilizó el tratamiento *L. lactis* + Ad-CRT/E7 y *L. lactis-E7* + Ad-CRT/E7 en donde observamos regresión tumoral total en 4 de 12 ratones para el primer tratamiento y 6/12 ratones para el tratamiento *L. lactis-E7* + Ad-CRT/E7 en el resto de los ratones de estos grupos encontramos un desarrollo tumoral pobre y lento, cabe resaltar que en el ultimo tratamiento en donde se hace una preinmunización con *L. lactis-E7* mas el Ad-CRT/E7 mostró un menor desarrollo del volumen tumoral y mayor cantidad de ratones con regresión tumoral total que el tratamiento en donde solo se utilizó *L. lactis* silvestre como preinmunización mas el Ad-CRT/E7.

Al analizar la supervivencia de los ratones (Fig. 12B) observamos que en los tratamientos combinados de *L. lactis-E7* + Ad-LacZ, *L. lactis* + Ad-LacZ y el control PBS, en donde en ninguno de ellos observamos un efecto antitumoral significativo, tampoco observamos un efecto positivo en la supervivencia, ya que para el día 50 posterior a las inmunizaciones ya habían muerto todos los ratones. Nuevamente encontramos

sobrevivientes en los grupos en donde utilizamos el Adenovirus que expresa la fusión de Calreticulina-E7, con la gran diferencia que al combinarlo con un *L. lactis* que expresa el antígeno E7 en su superficie se alcanzó un 70% de sobrevivientes los cuales se mantuvieron con una regresión completa del tumor y sin problemas aparentes por al menos 300 días. El grupo de ratones en donde se utilizó el tratamiento *L. lactis* silvestre + Ad-CRT/E7 tuvimos un comportamiento de la supervivencia mejor que los controles inicialmente mencionados, mas sin embargo para el día 100 solo quedó un 25% de ratones vivos y un 16.6% a los 300 días. De acuerdo con estos resultados podemos concluir que la preinmunización con *L. lactis*-E7 potencia el efecto antitumoral del Ad-CRT/E7 al disminuir el desarrollo del volumen tumoral y al aumentar la supervivencia.

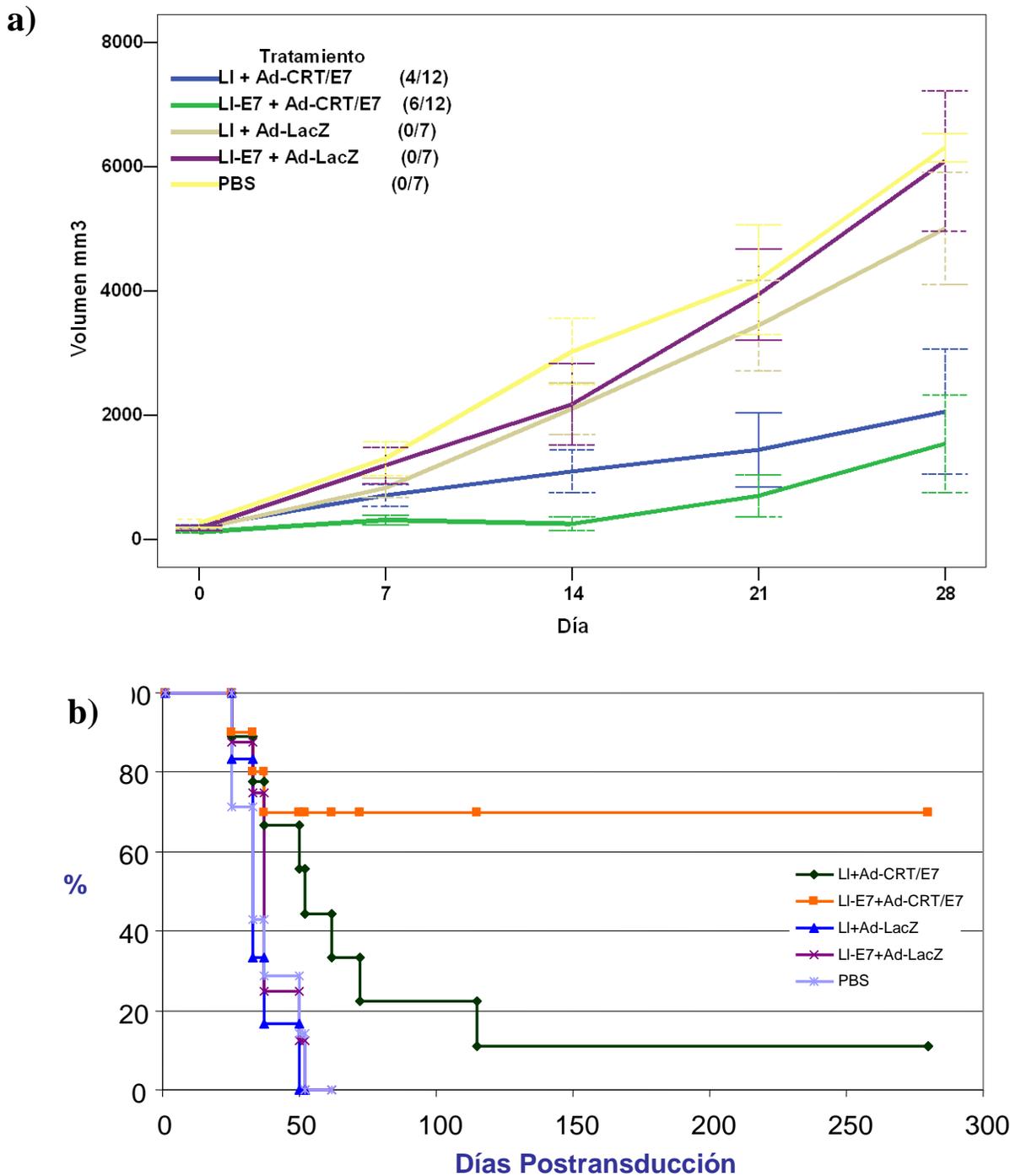


Fig. 12. Análisis del efecto antitumoral de un tratamiento combinado de LI-E7 y Adenovirus con CRT/E7. Se inmunizaron intranasalmente cinco grupos de ratones con *L. lactis*-E7, *L. lactis* silvestre o PBS a los días 0, 14 y 28. Después de una semana se inyectó s.c. células tumorales TC-1 en la pierna derecha. Cuando los tumores tenían entre 6-7 mm de diámetro, se administró intratumoralmente los diferentes Adenovirus a una dosis de 5×10^{10} PV en $20 \mu\text{L}$. Adenovirus y tamaño del grupo (n): *L. lactis*+Ad-CRT/E7 (n=12), *L. lactis*-E7+Ad-CRT/E7 (n=12), *L. lactis* silvestre+Ad-LacZ (n=7), *L. lactis*-E7+Ad-LacZ (n=7) y PBS (n=7). **(A) Crecimiento tumoral en función del tiempo.** El crecimiento tumoral fue monitoreado cada tres días, se calculó el volumen mediante la fórmula de un elipsoide y se graficaron las medias de cada grupo. Las líneas verticales punteadas corresponden al error estándar de cada grupo. Los grupos de *L. lactis*+Ad-CRT/E7 y *L. lactis*-E7+Ad-CRT/E7 fueron significativamente diferentes con una $P < 0.05$. **(B) Curva de supervivencia.** Se registró el porcentaje de ratones sobrevivientes por un periodo de 300 días.

5.3. El tratamiento con *Lactococcus lactis* E7 y adenovirus-CRT/E7 produce un mayor porcentaje de ratones con regresión tumoral completa.

Para hacer una correlación entre la supervivencia y la regresión tumoral graficamos el porcentaje de ratones libres de tumor al día 94 del experimento de la figura 12B y los resultados se presentan en un histograma de la Fig. 13. Podemos observar que los únicos ratones que sobrevivieron al reto tumoral fueron los de los dos grupos que en común habían recibido un tratamiento con el Ad-CRT/E7. Uno de estos grupos corresponde al tratamiento de *L. lactis* silvestre + Ad-CRT/E7 el cual a este tiempo todavía contaba con un 22% de ratones vivos, y más notablemente el grupo de *L. lactis* E7 + AdCRT/E7 contaba con un 70% de ratones vivos (Fig. 13) los ratones que tuvieron una regresión completa son los que a final de cuenta sobrevivieron al final del experimento.

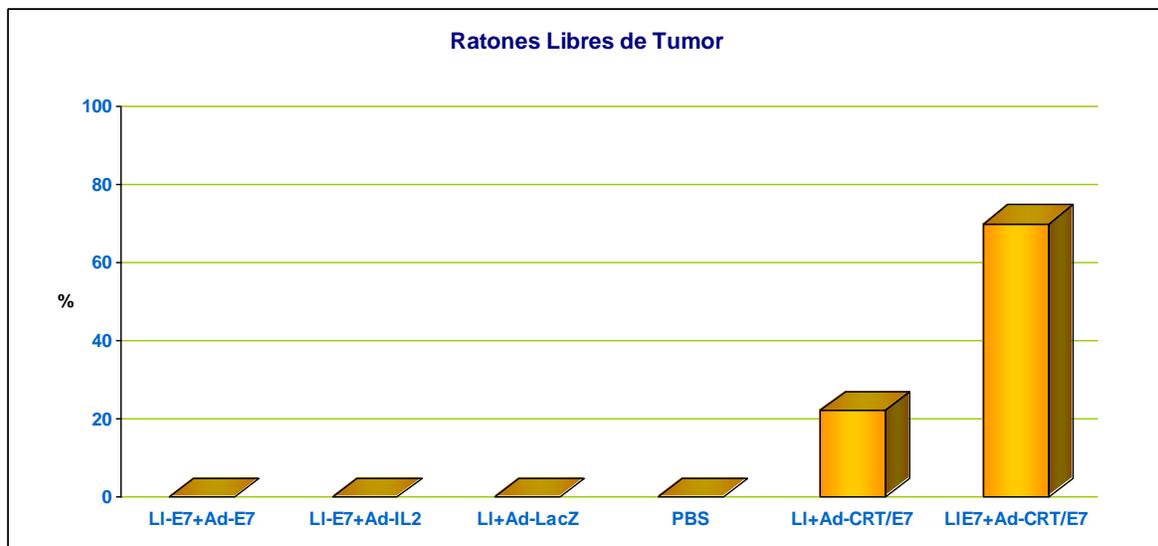


Figura 13. Porcentaje de ratones libres de tumor. Se utilizaron los resultados del experimento anterior y se graficó el porcentaje de ratones libres de tumor al los 94 días posterior a la implantación de las células TC1.

5.4. Los tumores en regresión del tratamiento combinado de *Lactococcus lactis*-E7 y Ad-CRT/E7 presentan infiltración de linfocitos T CD8⁺.

Como ya lo hemos mencionado la respuesta inmune celular está caracterizada por la acción conjunta de linfocitos y macrófagos cuyo fin es la destrucción o neutralización del agente extraño. Las células T citotóxicas (CD8⁺) representan una línea de defensa contra infecciones virales y para eliminar células transformadas. Con el propósito de determinar si el efecto antitumoral observado en nuestro modelo experimental era mediado por este tipo de células, decidimos evaluar la cantidad de linfocitos T CD8⁺ infiltrados en el tejido tumoral. Primeramente, mediante la técnica histológica de rutina con tinción HE se revisaron cortes histológicos de los tumores con y sin regresión. En los tumores sin regresión, que no tuvieron un efecto positivo a los tratamientos, encontramos una celularidad uniforme de células transformadas en todos los cortes en combinación de una vascularización notable. Un ejemplo de este comportamiento se muestra en la microfotografía de la Fig. 14B correspondiente al corte de un tumor desarrollado en un tratamiento control (*L. lactis* silvestre + Ad-LacZ) con abundante celularidad y vascularización (flechas blancas). En contraste en los cortes de tumores en regresión de los tratamientos que respondieron positivamente al tratamiento encontramos una disminución de la vascularización y un infiltrado de células muy semejantes a linfocitos, con núcleos redondeados, poco citoplasma y muy pigmentados; un ejemplo de este comportamiento lo podemos observar en la microfotografía de la Fig. 14A la cual corresponde a un corte de tumor en regresión del tratamiento combinado *L. lactis*-E7 + Ad-CRT/E7 en donde podemos observar el infiltrado de células parecidas a linfocitos (puntas de flecha blancas) y una vascularización deficiente.

Para comprobar que efectivamente el infiltrado celular correspondía a linfocitos se procedió a realizar una inmunohistoquímica con fluorescencia utilizando anticuerpos anti-CD8 marcados con FITC (anti ratón CD8-FITC). Con esta técnica encontramos en los cortes de tumores sin regresión ausencia de células teñidas positivamente, a diferencia de los cortes de tumores en regresión (Fig. 14C) en donde pudimos encontrar una gran cantidad de células teñidas positivamente de color verde fluorescente (puntas de flecha blancas) indicativo de la presencia de linfocitos CD8⁺.

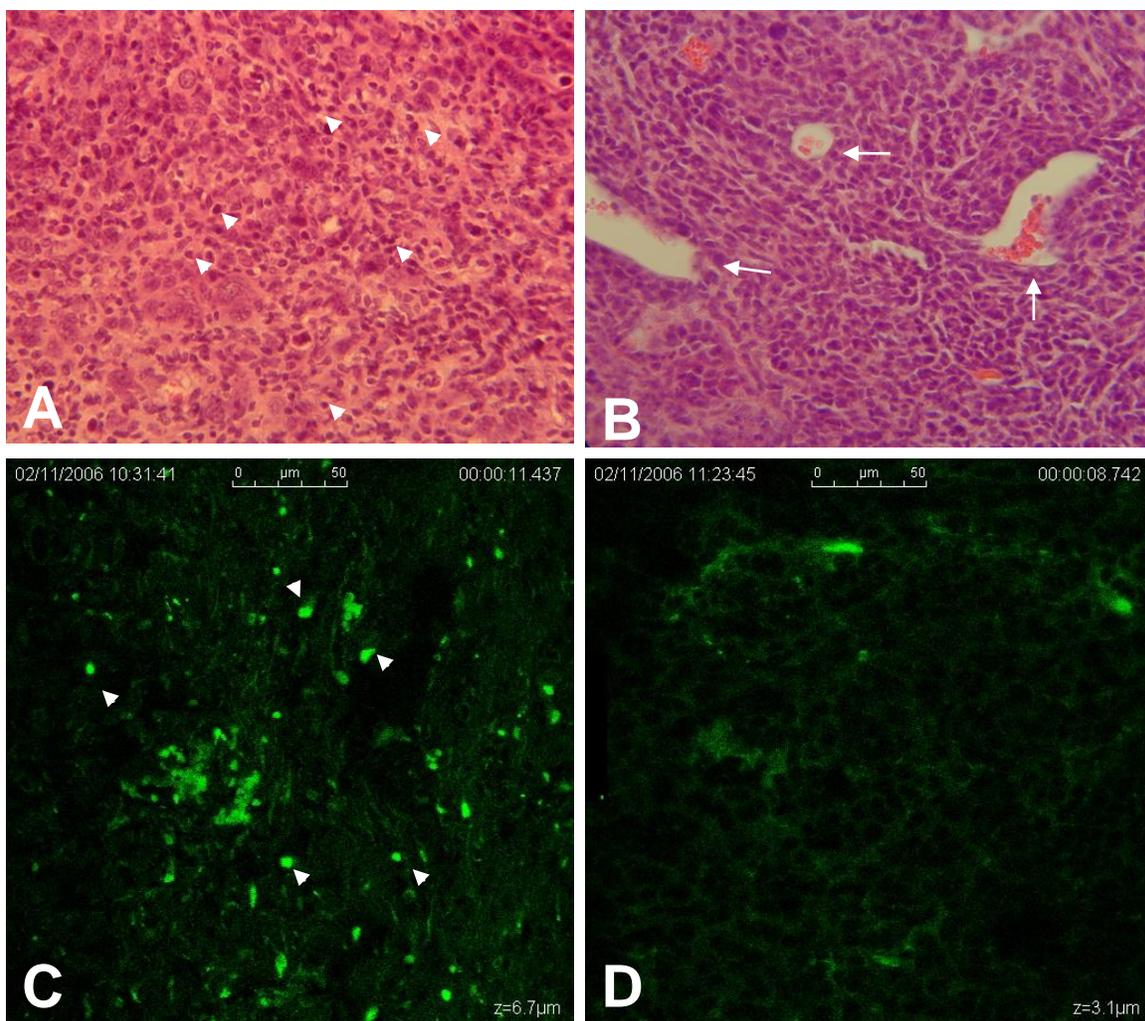


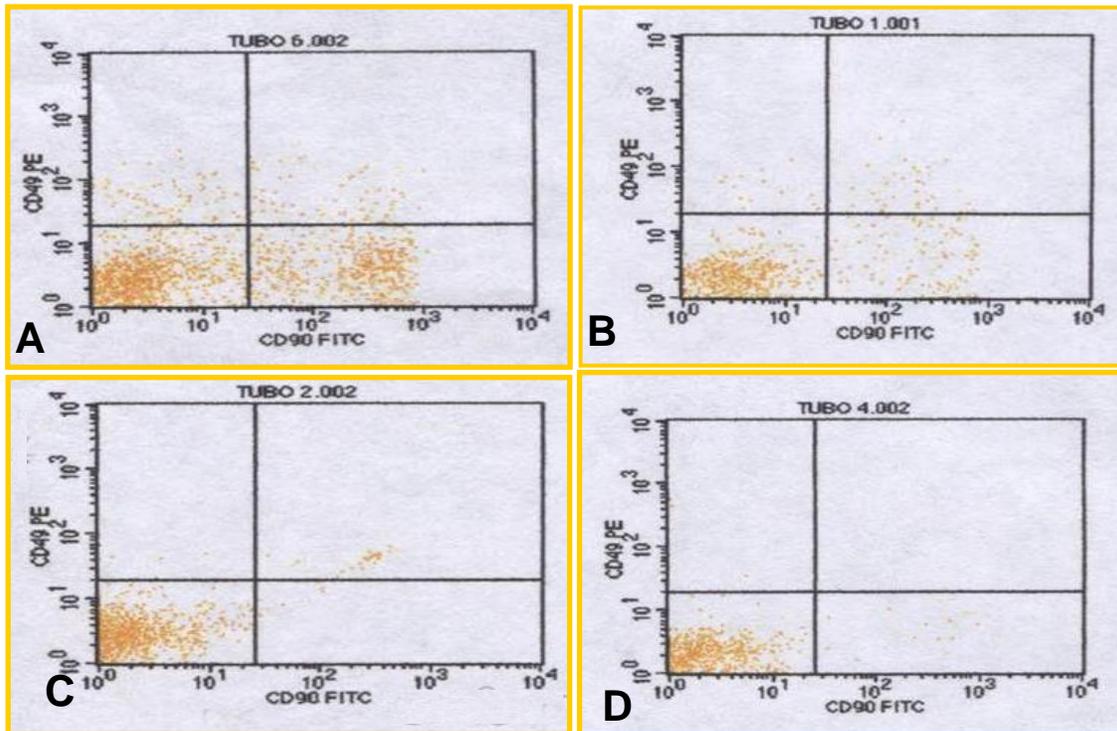
Fig 14. Análisis Histológico y por Inmunofluorescencia de Linfocitos T en los tumores en regresión. (A) y (C) Secciones de tumores en regresión visualizados con tinción con Hematoxilina y Eosina e inmunofluorescencia respectivamente; las puntas de flecha señalan linfocitos T infiltrados. (B) y (D) Secciones de tumores sin regresión visualizados con tinción con Hematoxilina y Eosina e inmunofluorescencia respectivamente, las flechas señalan vasos sanguíneos. A y B se observaron a 400X , C y D a 600X .

Además llevamos a efecto una asociación entre el desarrollo tumoral y el porcentaje de linfocitos T y NK. Esto se realizó por citometría de flujo analizando las células de bazo de ratones de los diferentes tratamientos, utilizando anticuerpos anti ratón contra linfocitos T (anti CD90-FITC) y contra linfocitos NK (anti CD49-PE). Encontramos que en los ratones sin regresión tumoral el porcentaje de linfocitos T (0.3-3.79 %) y NK (0.27-0.43) fue similar entre ellos (Fig. 16 B, C y D), mientras que en los ratones con regresión tumoral el porcentaje de linfocitos T y NK fue significativamente mayor con valores de 18.88 % y 2.68 %, respectivamente (Fig. 15A).

Este gran aumento en la cantidad de células asociadas a la respuesta inmune celular en los tumores de ratones que respondieron positivamente al tratamiento con regresión, nos hace pensar en la participación preponderante de la respuesta inmune celular en la eliminación del tumor.

5.5. Inducción de apoptosis en los tumores en regresión.

El mecanismo principal de la muerte celular producida por los linfocitos T citotóxicos es la liberación de las proteínas perforinas y granzimas, en donde las primeras forman canales acuosos que permiten el paso de las segundas que a su vez activarán las caspasas responsables de inducir apoptosis en las células blanco. Otra señalización de muerte por apoptosis ocurre cuando los linfocitos T citotóxicos expresan una proteína denominada Fas ligando que se une a las proteínas Fas de las células blanco.



	Tratamiento	% NK	% Linfocitos T
A	LI-E7+Ad-CRT/E7 (con regresión)	2.68	18.88
B	Ad-E7 (sin regresión)	0.43	3.79
C	LI-E7+Ad-LacZ (sin regresión)	0.27	0.3
D	PBS (sin regresión)	0.34	2.3

Figura 15. Cuantificación de linfocitos T y NK en los tratamientos con regresión tumoral por citometría de flujo en bazo de ratones con tumor. Se obtuvieron esplenocitos de ratones que mostraron tumores con y sin regresión. Se tomaron 2×10^6 , se reaccionaron con los anticuerpos correspondientes para la detección de Linfocitos T (anti CD90-FITC) y linfocitos NK (anti CD49-PE). En el tratamiento LI-E7 + Ad-CRT/E7 en donde encontramos regresión tumoral (A) observamos un aumento en el porcentaje de linfocitos T y NK diferente a los demás que no poseen regresión tumoral (B, C y D).

Dada la infiltración de linfocitos observada y su participación en la inducción de apoptosis, evaluamos la presencia de cuerpos apoptóticos en los tumores de los diferentes tratamientos analizados, mediante un ensayo de TUNEL.

Al aplicar el ensayo de TUNEL a cortes de tumores sin regresión, es decir tumores de ratones que no respondieron positivamente a los tratamientos, la presencia de células en apoptosis fue muy baja. Un ensayo representativo se muestra en la Fig. 16B donde observamos únicamente un cuerpo apoptótico (punta de flecha negra). Por el contrario en cortes de tumores que mostraron regresión tumoral, es decir que si respondieron al tratamiento, encontramos una gran cantidad de cuerpos apoptóticos. Un ensayo de TUNEL representativo se muestra en la Fig. 16A donde se observa una gran cantidad de células teñidas en color marrón indicativo de células en apoptosis (puntas de flecha color negro). Estos resultados nos indican que uno de los mecanismos involucrados en el efecto antitumoral de los tratamientos es a través de la inducción de apoptosis.

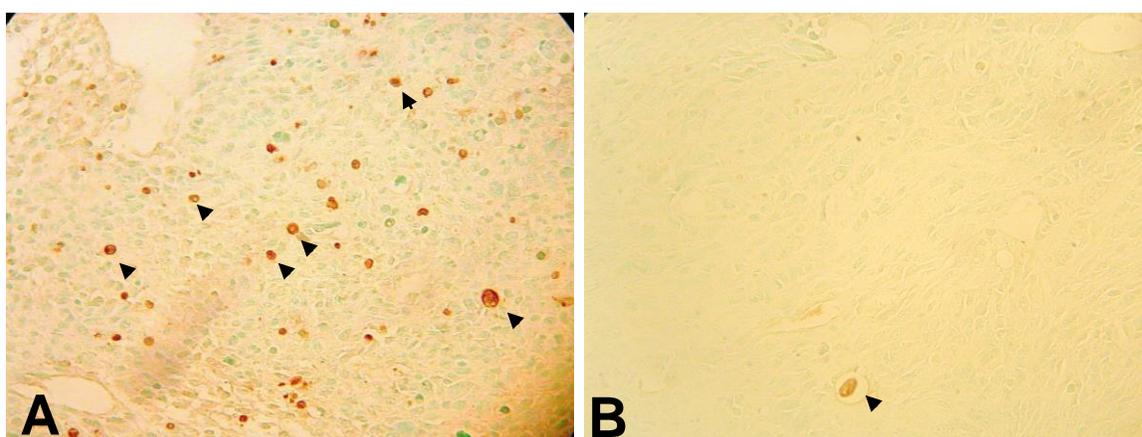


Figura 16. Detección de apoptosis por ensayo de TUNEL en tumores en regresión. Secciones de tumores en regresión (A) y sin regresión (B) se sometieron a un ensayo de apoptosis utilizando el kit de TREVIGEN. Las puntas de flecha señalan células en apoptosis. Amplificación 400X.

5.6. Inducción de IFN gamma en los ratones con tumor en regresión

El IFN- γ es la principal citosina de activación para macrófagos y realiza funciones importantes en el mecanismo de la inmunidad celular y es producida principalmente por los linfocitos T CD8+, TH1 CD4+ y NK durante la respuesta inmune. Es por esto, que también se evaluó la producción de IFN- γ , como un parámetro más de medición de inducción de una respuesta inmune celular. Este experimento consistió en obtener linfocitos de bazo de ratones de los diferentes tratamientos, exponerlos a las células tumorales TC-1 y medir su capacidad de secreción de IFN- γ mediante un ELISA. La concentración de IFN- γ en los grupos sin regresión tumoral LI-E7+Ad-LacZ y LI+Ad-LacZ fue casi nula y comparable a la concentración de IFN- γ del grupo de ratones normales a los que no se le hizo ninguna manipulación. En contraste en los tratamientos que presentaron un proceso de regresión tumoral (LI-E7+Ad-CRT/E7) la secreción de IFN- γ fue significativamente mayor en el orden de los 1400 pg/ml (Fig 17). Además aún y cuando el tumor ya había desaparecido (regresión total) se observó una producción significativa de IFN- γ en el orden de 750 pg/ml.

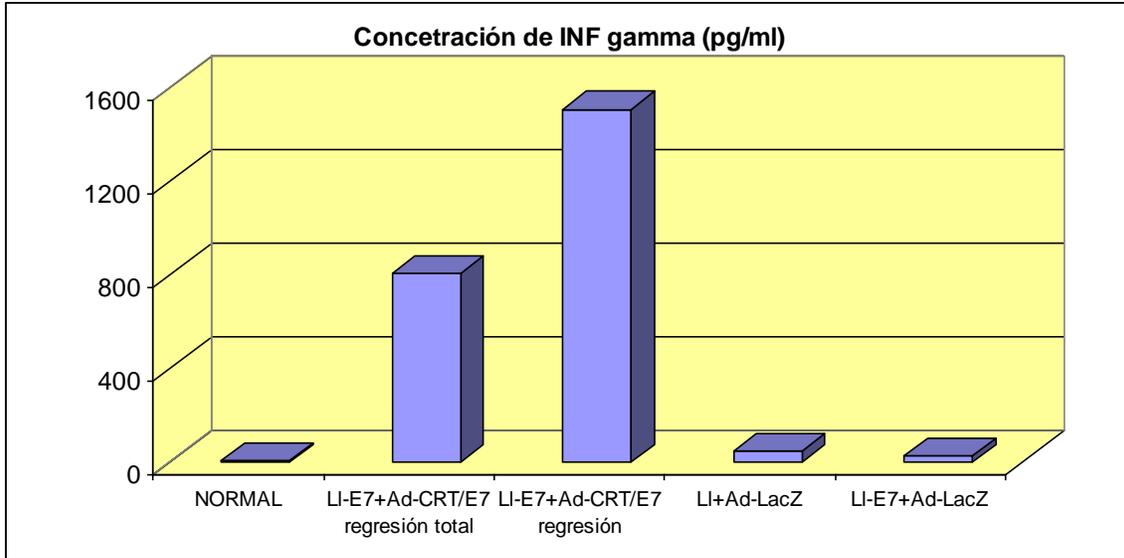


Figura 17. Detección de IFN- γ en los tumores en proceso de regresión. Se obtuvieron linfocitos de bazo de ratones con tumores en regresión y sin regresión y se cocultivaron con células tumorales TC1. Se incubaron por 3 días a 37 y se midió la concentración de IFN- γ en el medio de cultivo mediante un ensayo de ELISA. En ratones con tumores en proceso de regresión la concentración de IFN- γ es mayor.

Capítulo 6

DISCUSIONES

Los tratamientos que se manejan en la actualidad en contra del virus del papiloma humano causante del cáncer cérvico uterino, se basan en dos estrategias principales: la profiláctica y la terapéutica.

La primera estrategia se basa principalmente en crear inmunidad específicamente contra las proteínas de la cápside viral como son la L1 y la L2 para evitar la entrada del VPH al organismo. Esta estrategia ha tenido muy buenos resultados a la fecha, sin embargo existe un gran número de personas que desafortunadamente ya han adquirido el virus del papiloma humano y que además ya han desarrollado el cáncer cervicouterino. Para resolver esta problemática se utiliza la segunda estrategia, en la que se genera inmunidad en contra de las proteínas tardías encargadas de la transformación celular como lo son E6 y E7.

Nuestro principal interés fue establecer un tratamiento que previniera o atacara el desarrollo tumoral, es decir, implementar un tratamiento combinado que fuera tanto profiláctico como terapéutico, inovando en la forma de presentación del antígeno y enfocándonos en evitar o atacar el desarrollo tumoral.

En la primera etapa de nuestro trabajo evaluamos el efecto antitumoral de un adenovirus portando la proteína calreticulina fusionada a la proteína E7, en un modelo murino comúnmente usado como modelo animal del cáncer cervicouterino. La administración de Ad-CRT/E7 en ratones con tumor ya establecido dio como resultado un

efecto sorprendente en la regresión tumoral, es decir, observamos una disminución en los diámetros analizados hasta llegar a la desaparición total, mientras que en el adenovirus que expresa únicamente E7 todos los ratones murieron por consecuencia del desarrollo tumoral. Estos resultados muestran el gran efecto adyuvante que esta siendo ejercido por la Calreticulina de llevarse directamente el antígeno E7 al retículo endoplásmico que es donde finalmente se combinan los epítopes de los antígenos con el MHC1. Por otro lado también se ha observado que la calreticulina posee propiedades antiangiogénicas que también podrían estar contribuyendo al efecto antitumoral⁶⁴ al disminuir la vascularización y con ello el aporte de nutrientes. De hecho en un trabajo realizado por Kim J.W. en donde se utilizó inmunizó con DNA que expresa únicamente calreticulina, su efecto antitumoral fue 0% en comparación con 100% expresando Calreticulina-E7²⁰. Con los experimentos realizados en este trabajo no podemos inferir en que medida la actividad antiangiogénica de la Calreticulina pudiera estar contribuyendo en la inhibición del desarrollo tumoral. Los hallazgos histológicos obtenidos muestran que los tumores en regresión poseen una vascularización muy pobre, contrario a lo que se observa en los tumores con crecimiento sostenido que poseen una vascularización notable.

En la segunda etapa se trabajó con la evaluación del tratamiento profiláctico intranasal de *L. lactis* E7, para prevenir la formación de tumor en el modelo animal. Con este tratamiento los resultados no fueron satisfactorios, ya que la mayoría de ratones desarrollaron tumor y no hubo una diferencia muy grande con los controles utilizados. Cabe mencionar que nuestros resultados se contradicen con los resultados reportados previamente, los cuales mencionan que dicho tratamiento proporciona una protección

antitumoral casi del 35% con respecto a los controles⁷⁸. La única diferencia es la cantidad inoculada de células TC-1, que en nuestro trabajo correspondió al doble de células (100,000 células).

Cuando se pasó a la tercera etapa en donde se utilizó un tratamiento combinado, tanto profiláctico con el *L. lactis* E7 así como terapéutico con Ad-CRT/E7, observamos un aumento en el número de ratones con regresión tumoral total así como en la supervivencia comparado con los resultados obtenidos con el tratamiento terapéutico utilizando únicamente Ad-CRT/E7. Puesto que la aplicación intranasal de *L. lactis*-E7 induce la producción de anticuerpos contra E7³⁴, es posible que la presencia de dichos anticuerpos ayude a la eliminación del tumor a través de un mecanismo de Citotoxicidad mediada por anticuerpos.

Otro resultado importante fue la asociación entre una respuesta inmune celular y la regresión de los tumores. En el presente trabajo demostramos, mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para CD8⁺, que los tumores en regresión presentaron una gran infiltración de linfocitos T citotóxicos. Además, los linfocitos del bazo de estos mismos ratones, secretaron una cantidad significativa de IFN- γ al retarlos contra las células tumorales que expresan E7. Por otro lado, este mismo aumento de linfocitos T citotóxicos así como de células NK se observaron en los bazos de dichos ratones con regresión tumoral.

Finalmente también encontramos que la regresión tumoral esta asociada a una muerte celular por apoptosis. Es sabido que uno de los mecanismos mediante los cuales las células citotóxicas ejercen su acción es a través de la inducción de apoptosis. El mecanismo principal de la muerte celular producida por los linfocitos T citotóxicos es la liberación de las proteínas perforinas y granzimas, en donde las primeras forman canales acuosos que permiten el paso de las segundas que a su vez activarán las caspasas responsables de inducir apoptosis en las células blanco. Otra señalización de muerte por apoptosis ocurre cuando los linfocitos T citotóxicos expresan una proteína denominada Fas ligando que se une a las proteínas Fas de las células blanco. En particular utilizando el ensayo de TUNEL demostramos que en los tumores en regresión existe una gran cantidad de células en apoptosis. Este efecto se puede correlacionar con la gran cantidad de linfocitos infiltrantes los cuales podrían estar induciendo dicho efecto sobre las células tumorales.

La aportación principal de nuestro trabajo de investigación fue el demostrar que podemos utilizar la bacteria láctica *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie para inducir una respuesta inmune profiláctica que en combinación con una terapia adenoviral se genere un mayor efecto terapéutico en contra del desarrollo de tumores. La ventaja de utilizar el lactococcus para inmunizar es que no se requiere la purificación del antígeno a partir de la bacteria y ésta se puede administrar como tal. Por lo tanto esta bacteria puede ser utilizada en esquemas profilácticos de inmunización contra cancer cérvico uterino en la población general.

Capítulo 7

CONCLUSIONES

1. La calreticulina potencia notablemente el efecto inmunogénico y antitumoral del antígeno E7.
2. La preinmunización con *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie mejora el efecto terapéutico antitumoral y porcentaje de supervivencia.
3. El efecto antitumoral observado correlaciona con la inducción de una respuesta inmune celular.

Capítulo 8

LITERATURA CITADA

1. Mohar A, Frias-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora-Macías T, G de la Garza J. 1997. Descriptive epidemiology of cancer at the Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública Mex.* 39:253-258
2. Schiller JT. 1999. Papillomavirus-like particle vaccines for cervical cancer. *MolMedToday.* 5:209-215
3. Thomas M, Pim D and Banks L. 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene.* 18:7690-7700
4. Burd E. 2003. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology reviews.* 16,1. 1-17
5. Lorinez AT, Reid R, Jenson AB. 1992. Human papillomavirus infection of the cervix elative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol.* 79:318-329
6. Syrjänen,SM and Syrjänen KJ. 1999. New concepts on the role of human papillomavirus in the cell cicle regulation. *Ann.Med.* 31:175-187.
7. Ling M, Kanayama M, Roden R, Wu TC. 2000. Preventive and therapeutic Vaccines for Human Papillomavirus-associated cervical cancers. *J Biomed Sci.* 7:341-356
8. Lina-Villa L. 2003. Vaccines against papillomavirus infections and disease. *Salud Pública de Máxico.* 45:443-448
9. Wheeler C. 1997. Preventive vaccines for cervical cancer. *Salud Pública de México.* 39:1-5
10. Mahdavi A, Monk B. 2005. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer: Promises and Cahallenges. *Oncologist.* 10:528-538
11. Wlazlo A, Deng H, Giles-Davis W, Ertl H. 2004. DNA vaccines against the human papillomavirus type 16 E6 or E7 oncoproteins. *Cancer Gene Therapy.* 11: 457-464
12. He Z, Wlazlo AP, Kowalczyk DW. 2000. Viral recombinant vaccines to the E6 and E7 antigens of HPV-16. *Virology.* 270:146-161

13. Lamikanra A, Pan Z, Isaacs S, Wu T, Paterson Y. 2001. Regression of established Human papillomavirus type 16 (HPV-16) Immortalized Tumors in vivo by vaccinia viruses expressing different forms of HPV-16 E7 correlates with enhanced CD8+ T-Cell responses that home to the tumor site. *Journal of Virology*. 75:9654-9664
14. Chen L, Mizuno MT, Singhal MC, Hu HS, Galloway DA, Hellstrom I, Hellstrom KE. 1992. Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a syngeneic tumor expressing the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J. immunol*. 148:2617-2621
15. Chen LP, Thomas EK, Hu HS, Hellstrom I, Hellstrom KE. 1991. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:110-114.
16. Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB. 2001. Cell-Mediated Immune Response to Human Papillomavirus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8.2:209-220
17. Sipione S, Ewen C, Shostak I. 2005. Impaired cytolytic activity in calreticulin-deficient CTLs. *The journal of immunology* 174: 3212-3219
18. Basu S, Srivastava D. 1999. Calreticulin a Peptide-binding chaperone of the Endoplasmic Reticulum, elicits tumor and peptide-specific immunity. *J. exp. Med*. 189: 797-802
19. Wen-Fang C, Chien-Fu H, Chi-An C, Chien-Nan L, Yi-Ning S, Chee-Yin C, Botd D, Chang-Yao H, Wu TC. 2004. Characterization of DNA vaccines encoding the domains of calreticulin for their ability to elicit tumor-specific immunity and antiangiogenesis.
20. Kim JW, Hung CF, Juang J, He L, Kim TW, Armstrong DK, Pai S, Chen PJ, Lin CT, Boyd DA, Wu TC. 2004. Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Therapy*. 11:1011-1018
21. Gomez-Gutierrez JG, Elpek KG, Montes de Oca-Luna R, Shirwan H, Zhou HS, McMasters KM. 2006. Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunol Immunother*
22. Chen WF, Hung CF, Chai CY, Hsu KF, He L, Ling M, Wu TC. 2001. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a Tumor antigen. *J. Clin Invest* 108 (5): 669-78
23. Peng S, Tomson TT, Trimble C, He L, Hung CF, Wu TC. A combination of DNA vaccines targeting human papillomavirus type 16 E6 and E7 generates potent antitumor effects. *Gene Therapy*. 1-9

24. Hsieh CJ, Kim TW, Hung CF, Juang J, Moniz M, Boyd DA, He L, Chen PJ, Chen CH, Wu TC. 2004. Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. *Vaccine*. 22:3993-4001
25. De Vos WM. 1999. Gene Expression system for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:289-295
26. Arnau J, Hjerl-Hansen E, Israelsen H. 1997. Heterologous gene expression of bovine plasmid in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 48:331-338
27. Gaeng S, Scherer S, Neve H, Loessner M. 2000. Gene cloning and expression of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 66:2951-2958
28. Geoffroy MC, Guyard C, Quatannens B, Pavan S, Lange M, Mercenier A. 2000. Use of green fluorescent protein to tag lactic acid bacterium strains under development as live vaccine vectors. *Appl Environ Microbiol.* 66:383-391
29. Seegers JF. 2002. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol.* 12:508-15
30. Kaur IP, Chopra K, Saini A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Science.* 15:1-9
31. Mercenier A, Pavan S, Pot B. 2003. Probiotics as Biotherapeutic Agents: Present Knowledge and future Prospects. *Current Pharmaceutical Design.* 9: 175-191
32. Drouault S, Corthier G, Ehrlich S, Renault P. 1999. Survival, physiology and Lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl Environ Microbiol.* 65:4881-4886
33. Bermúdez-Humarán L, Cortez-Perez N, Le Loir Y, Gruss A, Rodriguez-Padilla C, Saucedo-Cárdenas O, Langella P, Montes de Oca-Luna R. 2003. Fusion to a carrier protein and a synthetic propeptide enhances E7 HPV-16 production and secretion in *Lactococcus lactis*. *Biotech Prog.* 19:1101-1104.
34. Cortez-Perez NC, Bermudez-Humarán LG, Le Loir Y, Rodriguez-Padilla C, Gruss A, Saucedo-Cárdenas O, Langella P, Montes de Oca-Luna R. 2003. Mice immunization with recombinant lactococci displaying a surface HPV-16 E7 oncoprotein. *FEMS Microbiol Lett.* 229:37-42
35. Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karrow RA, Dibner J, Schiller JT, Lowy DR. 2001. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J.Natl. Cancer Inst.* 93:284-292
36. Jin XW, Cash J, Kennedy AW. 1999. Human papillomavirus typing and the reduction of cervical cancer risk. *Cleveland Clin. J. Med.* 66:533-539.

37. Castañeda-Iñiguez M, Toledo-Cisneros R, Aguilera-Delgadillo M. 1998. Factores de riesgo para cáncer cervicouterino en mujeres de Zacatecas. *Salud Publica Mex.* 40:330-338.
38. Salinas-Martínez AM, Villareal-Rios E, Garza-Elizondo ME, Fraire-Gloria JM, López-Franco JJ, Barbosa-Quintana O. 1997. Calidad del Programa de Detección oportuna de cancer cervicouterino en el estado de Nuevo León. *Salud Publica Mex.* 39:187-194.
39. Franco EL. 1995. Cancer causes revisited:human papillomavirus and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:779-780.
40. Muñoz N, Bosch X. 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud pública de México.* 39:274-282
41. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. 1999. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189:12-19
42. Muñoz N, Bosch X, De San José S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K, Snijders P, Meijer C. 2003. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med.* 348:518-27
43. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 60:1445-1456.
44. Sanclemente G. 2003. Lo que los clínicos deben saber acerca de las vacunas contra el virus del papiloma humano. *Gac Med Mex.* 139 (2): 173-183
45. Giroglu T, Florin L, Schafer F, Sireck RE and Sapp M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. virol.* 75:1565-1570
46. Frezer IH, Thomas R, Zhou J, Leggatt GR, Dunn L, McMillan N, Tindie RW, Filgueira L, Manders P, Bamard P, Sharkey M. 1999. Potential strategies utilized by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol Rev.* 168:131-142.
47. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, López-Botet M. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 18:89-95
48. Roitt I, Brostoff J, Male D. 1998. *Immunology*, fifth edition. Mosby International. 1-10. 83-85, 121-142

49. Stevens A, Lowe J. 1998. *Histología Humana 2a*. Ed. Harcourt Brace. p117-122.
50. Spee P, Neefjes J. 1997. TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur J Immunol.* 27.9:2441-9.
51. Baumann O, Walz B. 2001. Endoplasmic reticulum of animals cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol.* 205:149-214
52. Sitia R, Braakman I. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature.* 426: 891-894
53. Berridge M. 2002. The endoplasmic reticulum a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 32:235-249
54. Corbett E, Michalak M. 2000. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum?. *Trends Biochem Sci.* 25:307-311
55. Molinari M, Helenius A. 2000. Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science.* 288: 331-333
56. Groenendyk J, Michalak M. 2005. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. *Acta Biochimica Polonica.* 52: 381-395
57. Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity.* 5.2:103-14.
58. Conway EM, Liu L, Nowakowski B, Steiner-Mosonyi M, Ribeiro SP, Michalak M. 1995. Heat Shock-sensitive expression of calreticulin. *The Journal of Biological Chemistry.* 270:17011-17016
59. Nash PD, Opas M, Michalak M. 1994. Calreticulin: not just another calcium-binding protein. *Mol Cell Biochem.* 15.135(1):71-78
60. Udono H, Srivastava P. 1994. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *J. Immunol.* 152: 5398-5403
61. Srivastava P. 1993. Peptide-binding heat shock proteins in the endoplasmic reticulum: role in immune response to cancer and antigen presentation. *Adv. Cancer Res.* 62: 153-177
62. Ishii T, Udono H, Yamano T, Ohta H, Ueneka A, Ono T, Hizuta A, Tanaka N, Srivastava P, Nakayama E. 1999. Heat shock proteins as chaperones of MHC I-binding peptides and their precursors. *J. Immunol.* 162: 1303-1309

63. Blachere N, La Z, Chandawarkar R, Suto R, Jaikaria N, Basu S, Udono H, Srivastava P. 1997. Heat shock protein-peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.* 176: 1315-1319
64. Pike S, et al. 1999. Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood.* 94: 2461-2468.
65. Guzman-Rojas L, Alcocer-Gonzalez JM, Madrid-Marina V. 1998. Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra el cáncer cervicouterino. *Salud Pública Mex.* p40:38-46
66. Da Silva DM, Elben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, Valders MF, Kast WM. 2001. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol;* 186:169-182
67. Jabbar IA, Fernando GJ, Saunders N, Aldovini A, Young R, Malcolm K, Frazer IH. 2000. Immune responses induced by BCG recombinant for human papillomavirus L1 and E7 proteins. *Vaccine.* 22: 2444-2453
68. Ludono LP, Chafield, Tindle RW, Herd K, Gao XM, Frazer I, Dougan G. 1996. Immunization of mice using Salmonella expressing human papillomavirus type 16 E7 epitopes inserted into hepatitis B virus core antigen. *Vaccine.* 14:545-552
69. Bermudez-Humarán LG, Langella P, Miyoshi A, Gruss A, Tamez-Guerra R, Montes de Oca-Luna R, Le Lior Y. 2002. Production of human Papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.;*68:917-922
70. Liu D, Tsao Y, Kung J, Ding Y, Sytwu H, Xiao X, Chen S. 2000. Recombinant Adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer. *Journal of virology.* 74:2888-2894
71. Rozalén J, Ceña V, Jordán J. 2003. Terapia Génica. Vectores de expresión. *OFFARM.* 22:102-108
72. Miyoshi A, Poquet I, Azevedo V, Commissaire J, Bermudez-Humarán L, Domakova E, Le Lior Y, Oliveira SC, Gruss A, Langella P. 2002. Controlled Production of Stable Heterologous Proteins in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 :3141-3146.
73. Bermudez-Humarán L, Langella P, Cortés-Perez N, Gruss A, Tamez-Guerra R, Oliveira S, Saucedo-Cárdenas O, Montes de Oca-Luna R, Le Lior Y. 2003. Intranasal Immunization with Recombinant *Lactococcus lactis* Secreting Murine Interleukin-12 Enhances Antigen-specific Th1 Cytokine Production. *Infect. Immun.* 71:1887-1896

74. Scholl SM, Michaelis S, McDermott R. 2003. Gene Therapy Applications to Cancer Treatment. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1:35-47.
75. Sánchez-De la Rosa R, Sánchez-De la Rosa E, Rodríguez-Hernández N. 2001. Interleucina 12 Vs. Enfermedades infecciosas. *Rev Cubana Med*. 40(2):118-121
76. Lowin B, Hahne M, Mattma C. 1994. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370: 650
77. Hallez S, Simon P, Maudoux F, Doyen J, Noel J, Beliard A, Capelle X, Buxant F, Fayt I, Lagrost A, Humbert P, Gerdau C, Burny A, Boniver J, Foidart J, Delvenne P, Jacobs N. 2004. Phase I/II trial of immunogenicity of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein-based vaccine in women with oncogenic HPV-positive cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer Immunol Immunother* 53:642-650.
78. Bermúdez-Humarán LG, Cortes-Perez N, Lefèvre F, Guimaraes V, Rabot S, Alcocer-Gonzalez JM, Gratadoux JJ, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra RT, Corthier G, Gruss A, Langella P. 2005. A Novel Mucosal Vaccine Based on Live Lactococci Expressing E7 Antigen and IL-12 Induces Systemic and Mucosal Immune Responses and Protects Mice against Human Papillomavirus Type 16-Induced Tumors. *The Journal of Immunology*, 175: 7297–7302.

Anexo I

Preparación de soluciones

Acetato de amonio 5M

Disolver 385g de acetate de amonio en 800ml de H₂O. Ajustar el volumen a 1 litro con H₂O, esterilizar por filtración.

Acetato de potasio 5 M pH 5.2

Disolver 49 g de acetato de potasio en agua destilada, ajustando el pH a 5.2 con ácido acético glacial. Aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

Acetato de sodio 3 M pH 5.2

Disolver 24.61 g de acetato de sodio en agua destilada, ajustando el pH a 5.2 con ácido acético glacial. Aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

Azul de Comassie

0.25g de azul brillante de Comassie R250 se disuelven en 90 ml de metanol al 50% y 10 ml de ácido acético Glacial, filtrar esta solución.

Bicarbonato de Sodio 1M

Disolver 4.2g de NaHCO_3 en 50ml de H_2O

Buffer Citrato 0.01M

Diluir 1.05g de Ácido Cítrico monohidratado en 500ml de H_2O y esterilizar por filtración.

Buffer de Fosfatos 0.2M pH 7.2-7.4

Mezclar 6.4 g de Fosfato monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 21.8g de Fosfato Dibásico de Sodio (Na_2HPO_4), 1 ml de Tritón al 100X y aforar e 1L con H_2O .

Buffer TAE 50X

Mezclar 242 g de tris, 57.1 ml de ácido acético glacial, y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0.

Aforar a 1,000 ml con agua destilada. Diluir 50 veces (TAE 1X).

Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer Tris-HCl 1 M pH 6.8

Disolver 7.2 g de tris en agua destilada, ajustando el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 60 ml.

Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Disolver 10.89 g de Tris en agua destilada, ajustando el pH a 8.8 con HCl concentrado.

Aforar a 60 ml.

Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

EDTA 0.5 M pH 8.0

Disolver 18.6 g de EDTA en agua destilada, y ajustar el pH a 8.0 con 2 g de perlas de NaOH. Aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

Carbonato de Sodio 1M

Diluir 5.29g de Na₂CO₃ en 50 ml de H₂O

Cloruro de Magnesio 1M

Disolver 203.3g de MgCl₂.6H₂O en 800 ml de H₂O. Ajustar el volumen a 1L.

Cloramfenicol 100mg/ml

Diluir 100mg de Cloramfenicol en 1 ml de Alcohol absoluto, se utiliza colocando 10µl por cada 100 ml de medio.

Cloruro de sodio

Disolver 292.2g de NaCl en 800 ml de H₂O, ajustar el volumen a 1 litro. Esterilizar en autoclave.

Medio M17 p/*Lactococcus lactis*

Resuspender 37.25g de medio M17 en 1 litro de H₂O, mezclar y autoclavar 15 min a 121°C a la par esterilizar glucosa al 50%, preparar medio M17 con Glucosa al 1% y CM al 10µg/ml (para el control no poner CM)

Fosfato de potasio monobásico 1 M

Disolver 135.5 g de fosfato de potasio monobásico en 1,000 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

Fosfato de potasio dibásico 1 M

Disolver 173.5 g de fosfato de potasio dibásico en 1,000 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

Glucosa 2 M

Disolver 18.02 g de glucosa en 50 ml de agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

Jugo azul 6X

(Azul de bromofenol 0.25%, Xilencianol 0.25%, Glicerol 30%)

Mezclar 25 mg de azul de bromofenol y 25 mg de xilencianol con 3 ml de glicerol. Aforar con agua destilada a 10 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

SDS 10%

Disolver 10 g de SDS en 90 ml de agua destilada. Calentar a 68°C para facilitar su disolución.

Ajustar pH a 7.2 con HCl concentrado y aforar a 100 ml.

Almacenar a temperatura ambiente.

PBS 10X

Mezclar 80g de NaCl, 2g de KCl, 14.4g de Na₂HPO₄ y 2.4g de KH₂PO₄ y disolver los reactivos en 800ml de H₂O destilada ajustar el pH a 7.2 o 7.4 y aforar a 1 litro, esterilizar por autoclave.

Paraformaldehido 4%

Diluir 40g de paraformaldehido con H₂O destilada a 60°C por 30 minutos, adicionar 100ml de PBS 10X, ajustar el pH a 7.2, aforar con H₂O a la cantidad deseada. Hacer alícuotas y almacenar a -20°C.

Tris 1 M

Disolver 121.1 g de tris base en 700 ml de agua destilada.

Ajustar pH con HCl concentrado como sigue:

pH	HCl
7.4	70 ml
7.6	60 ml
8.0	42 ml

Aforar a 1,000 ml con agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente.

RESUMEN CURRICULAR

Blanca Rocío Rangel Colmenero

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología

Tesis: “Efecto de una preinmunización con *Lactococcus lactis* expresando el antígeno E7 del VPH-16 sobre la protección antitumoral inducida por adenovirus que expresan E7, IL-2 y calreticulina/E7”

Campo de Estudio: Morfología

Datos Personales: Nacida en C. Madero Tamaulipas el 5 de Enero de 1978, hija de René Carlos Rangel Lozano y Feliciano Colmenero Alonso.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado obtenido de Biólogo, en 1999. Egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Morfología en el 2003.

Experiencia Profesional: Realización del servicio social en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Biología en 1998. Tesista de licenciatura en el departamento de citogenética, Facultad de Medicina, UANL de 1998 al 2000. Tesista de Maestría en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UANL del 2000 al 2003. Tesista de Doctorado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UANL del 2003 al 2007. Becario en Investigación en el Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste-IMSS, de Marzo de 2006 a Febrero del 2007.