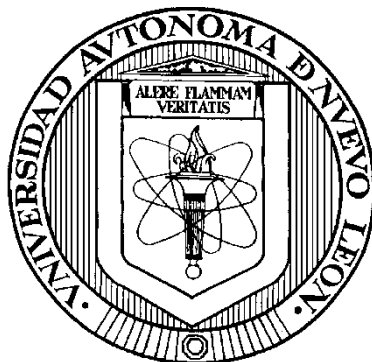


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VIVO* DE UN ADENOVIRUS
ONCOLÍTICO QUE EXPRESA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE
PS/SA/E7/4-1BBL**

Por

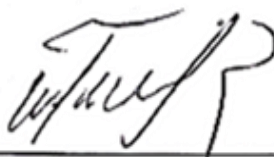
ALEJANDRA GUADALUPE MARTÍNEZ PÉREZ

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

JULIO/2023

**"ANÁLISIS DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VIVO* DE UN ADENOVIRUS
ONCOLÍTICO QUE EXPRESA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE
PS/SA/E7/4-1BBL"**

Aprobación de tesis:



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna
Director



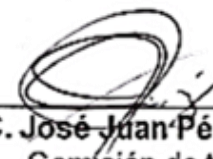
Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas
Co-Director



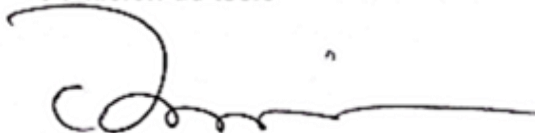
Dra. C. María de Jesús Loera Arias
Comisión de tesis



Dra. C. Aracely García García
Comisión de tesis



Dr. C. José Juan Pérez Trujillo
Comisión de tesis



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


**“ANÁLISIS DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VIVO* DE UN ADENOVIRUS
ONCOLÍTICO QUE EXPRESA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE
PS/SA/E7/4-1BBL”**

Presentado por

M.C. ALEJANDRA GUADALUPE MARTÍNEZ PÉREZ

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna y la co-dirección de la Dra. C. Odila

Saucedo Cárdenas.



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna
Director



Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas
Co-Director

“Primum non nocere”

Hipócrates

DEDICATORIA

A la niña que un día soñó...

...con todo mi esfuerzo y dedicación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por su dirección en el desarrollo de este proyecto, por sus acertadas intervenciones y consejos para mejorar profesionalmente.

Gracias a las Doctoras: Odila Saucedo Cárdenas, María de Jesús Loera Arias Aracely García García y Sheila Adela Villa Cedillo por sus precisas observaciones en el desarrollo de este trabajo y por ser ejemplo de mujeres científicas.

Le agradezco profundamente al Dr. José Juan Pérez Trujillo por ser guía durante el trabajo experimental y por el apoyo físico y moral en los momentos difíciles.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A mis amigos y compañeros de viaje, por las incontables anécdotas durante todos estos años, por sus palabras de aliento y apapachos cuando más los necesité, me los llevo en el corazón.

A mi familia, por siempre creer en que puedo lograr todo aquello que me proponga, por ser motivo y apoyo incondicional.

RESUMEN

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

Fecha de titulación: Julio 2023

Título del estudio: ANÁLISIS DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VIVO* DE UN ADENOVIRUS ONCOLÍTICO QUE EXPRESA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PS/SA/E7/4-1BBL

Páginas del estudio: 75

Área del estudio: Morfología

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

Propósito y método del estudio:

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, para la cual no existe una terapia que sea del todo exitosa. La inespecificidad de las terapias convencionales conlleva una serie de efectos secundarios importantes, que comprometen la calidad de vida de los pacientes. La inmunoterapia contra el cáncer es una estrategia prometedora para tratar y curar ciertos tipos de cáncer; mediante la estimulación específica del sistema inmunitario contra las células tumorales utilizando antígenos asociados a tumores (AAT) y moléculas inmunoestimulantes. El inmunoestimulante 4-1BBL pertenece a la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral, conocido por su potente activación de células T en modelos de terapia antitumoral. En ensayos clínicos se ha reportado su uso para inducir la respuesta inmune Th1 mediada por células T reactivas específicas de AAT que producen IFN- γ . La fusión del antígeno E7 y 4-1BBL en un solo gen, así como la adición de la secuencia péptido señal para su envío a retículo endoplásmico, induce una respuesta específica de tumor que confiere un potente efecto antitumoral en un modelo murino de cáncer. Los adenovirus son reportados como los vectores más efectivos para mejorar la terapia de células T contra tumores sólidos; por lo que el propósito del presente trabajo fue expresar la fusión génica en el contexto de un adenovirus oncolítico (AdO) para evaluar el efecto tumoral profiláctico y terapéutico, así como la capacidad de inducir una respuesta inmune específica de tumor en un modelo murino de cáncer.

Conclusiones y contribuciones:

El AdOE7 demostró un potente efecto antitumoral profiláctico y terapéutico en un modelo murino de cáncer cervicouterino (CaCu), con la capacidad de estimulación del sistema inmune de forma específica en contra de las células tumorales; siendo una alternativa segura para los tejidos no tumorales.

Consideramos que esta estrategia basada en el uso de AdO podría ser más eficiente al simplificar el costo de producción, lo cual se traduciría en un menor costo para los sistemas de salud. Esta estrategia, en particular, podría contribuir en la generación de vacunas terapéuticas con mayor eficacia contra el cáncer cervicouterino tan necesarias en nuestro país.



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna
Director

CONTENIDO TEMÁTICO

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL	4
VIROTERAPIA ONCOLÍTICA.....	7
4-1BB.....	9
4-1BBL.....	9
COMPLEJO 4-1BB/4-1BBL	11
SA-4-1BBL.....	11
4-1BBL EN ESTUDIOS CLÍNICOS Y PRECLÍNICOS	14
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
MATERIALES	23
CONSTRUCCIÓN GÉNICA PS-SA-E7-4-1BBL	23
ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS RECOMBINANTES	23
LÍNEAS CELULARES.....	23
ANIMALES DE LABORATORIO	24
ANTICUERPOS.....	24
MEDIOS DE CULTIVO	25
REACTIVOS	25
SOLUCIONES	25
CONSUMIBLES.....	26

EQUIPO DE LABORATORIO	26
MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD	28
METODOLOGÍA	29
ENSAYOS ANTITUMORALES PROFILÁCTICO Y TERAPÉUTICO	29
ENSAYO DE RESPUESTA INMUNE	32
ENSAYO DE DISTRIBUCIÓN Y SEGURIDAD	34
RESULTADOS.....	38
EFECTO ANTITUMORAL TERAPÉUTICO DEL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO.	38
EFECTO ANTITUMORAL PROFILÁCTICO DEL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO.	40
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LA INMUNIZACIÓN CON EL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO	44
ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN Y SEGURIDAD DEL USO DEL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO.....	50
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
APÉNDICE.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de diferenciación de células T CD8+ efectoras y de memoria.....	4
Figura 2. Fases durante la interacción entre el sistema inmune y las células tumorales.....	5
Figura 3. Replicación de los adenovirus oncolíticos en células tumorales y no tumorales.....	7
Figura 4. Modificaciones realizadas en el genoma del adenovirus 5 WT para hacerlo condicionalmente replicativo.....	8
Figura 5. Vía de señalización intracelular activada por el adyuvante SA-4-1BBL.....	12
Figura 6. Esquematización del ensayo terapéutico.....	30
Figura 7. Esquematización del ensayo profiláctico.....	31
Figura 8. Esquematización del ensayo de respuesta inmune.....	33
Figura 9. Esquematización del ensayo de distribución.....	35
Figura 10. Curva estándar de concentración viral de stock AdOE7	37
Figura 11. Efecto antitumoral terapéutico <i>in vivo</i>	39
Figura 12. Sobrevida de los murinos del ensayo terapéutico.....	40
Figura 13. Efecto antitumoral profiláctico <i>in vivo</i>	41

Figura 14. Sobrevida de los murinos del ensayo profiláctico.....	42
Figura 15. Ensayo profiláctico con un segundo reto tumoral.....	43
Figura 16. Efecto antitumoral profiláctico con diferentes diluciones del AdOE7.....	44
Figura 17. Perfil de citocinas Th1/Th2/Th17.....	46
Figura 18. Niveles de IFN- γ en sobrenadantes de células mononucleares estimuladas con E7.....	47
Figura 19. Citocinas Th2/Th17 secretadas por esplenocitos en respuesta a la estimulación con antígeno E7.....	48
Figura 20. Detección de células productoras de IFN- γ en respuesta a la estimulación con el antígeno E7.....	49
Figura 21. Perfil de distribución del AdOE7.....	51
Figura 22. Detección de la proteína viral hexón en tejido pulmonar, hepático y tumoral.....	52
Figura 23. Cambios morfológicos en los principales órganos de distribución del AdOE7.....	53
Figura 24. Efecto del AdOE7 sobre tejido tumoral.....	54
Figura 25. Poblaciones de linfocitos efectores CD8 α , CXCR1 y CXCR3 en tejido tumoral.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. SA-4-1BBL en estudios preclínicos.....	15
Tabla 2. 4-1BBL en estudios clínicos.....	16

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grado Celsius
4-1BB	Receptor de 4-1BB
4-1BBL	Ligando de 4-1BB
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AAT	Antígeno asociado a tumor
AdO	Adenovirus Oncolítico
CaCu	Cáncer Cervicouterino
cm ²	Centímetro cuadrado
E7	Antígeno E7
g	Gramo
IFN- γ	Interferón gamma
ITR	Repetición terminal invertida (del inglés "Inverted Terminal Repeat")
KCl	Cloruro de Potasio
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
L	Litro

mg	Miligramo
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sodio dibásico
NaCl	Cloruro de Sodio
pb	Pares de bases
PS	Péptido señal
SA	Estreptavidina
UI	Unidades infecciosas
VPH	Virus del Papiloma Humano
WT	Silvestre (del inglés "Wild Type")
μL	Microlitro

INTRODUCCIÓN

La incidencia del cáncer continúa en aumento alrededor del mundo, reportando más de 19 millones de casos y cerca de 10 millones de muertes por esta causa en el año 2020 (Sung et al., 2021). Dentro de los principales factores de riesgo para contraer cáncer se encuentra el padecer infecciones crónicas y persistentes por algunos tipos de papilomavirus humanos como ocurre con mayor incidencia en países de ingresos medios y bajos (Cáncer, s. f.). El virus del papiloma humano ocupa el segundo lugar a nivel mundial como agente infeccioso causal de cáncer en ambos géneros (Plummer et al., 2016).

Actualmente existen tres vacunas preventivas disponibles enfocadas contra distintos serotipos del papiloma humano: Cervarix (GlaxoSmithKline), Gardasil (Merck Inc.) y Gardasil 9 (Merck Inc.); sin embargo, el acceso universal a la vacuna es relativamente limitado (Bruni et al., 2016). Una vez establecido el cáncer, actualmente existen opciones de tratamiento que incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia, las cuales a pesar de ser eficientes tienen la desventaja de presentar una alta tasa de recurrencia, así como efectos secundarios importantes.

Se reporta una tasa de supervivencia global de 63-68% a los 5 años del cáncer en general (Siegel et al., 2021). Con el fin de superar tales limitantes se exploran nuevos enfoques terapéuticos. La terapia génica es una tecnología que utiliza ADN genéticamente modificado que puede codificar para diferentes proteínas, antígenos y moléculas inmunoestimulantes (Khan, 2013); éste puede ser

administrado como ADN desnudo o a través de vectores; estos últimos a su vez se dividen en virales y no virales.

El ligando 4-1BBL ha demostrado efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmune al unirse con su receptor 4-1BB. Además, está demostrado que utilizando complejos proteicos de antígenos con una forma quimérica del adyuvante (SA-4-1BBL) incrementa la respuesta inmune antitumoral (Sharma, Schabowsky, et al., 2010). En nuestro grupo de trabajo se ha logrado simplificar el sistema de complejos proteicos mediante la fusión génica del 4-1BBL con el antígeno E7, la estraptavidina (SA) y el péptido señal para la secreción (PS) en un solo gen policistrónico.

Además, se probó su efecto antitumoral como vacuna de ADN mediante biobalística en un modelo animal de cáncer cérvico uterino que expresa como antígeno la proteína E7 (Garza-Morales et al., 2019). Entre las ventajas que tienen las vacunas de ADN, se encuentran su fácil uso, bajo costo y especialmente, su capacidad para estimular respuestas inmunes tanto celulares como humorales, sin embargo, este efecto se ha limitado a modelos preclínicos, ya que han mostrado poca inmunogenicidad en ensayos en humanos (Lopes et al., 2019).

La pobre eficiencia de entrega de genes es el principal factor limitante para la mayoría de las terapias génicas *in vivo* (Kamensek et al., 2018; Keskin et al., 2019). Los adenovirus destacan como uno de los sistemas más eficientes para la entrega de genes (Lee et al., 2017), siendo los de replicación competente los más utilizados en la terapia génica contra el cáncer, ya que están diseñados para

replicarse preferentemente en las células tumorales y destruirlas a través del proceso lítico natural de replicación viral (Wold & Toth, 2013).

Recientemente, nosotros diseñamos un adenovirus oncolítico que es capaz de dirigir la expresión de la proteína PS-SA-E7-4-1BBL hacia el retículo endoplásmico en células tumorales y no tumorales, e inducir un efecto de lisis selectiva a células tumorales *in vitro* (Martínez-Pérez, 2019).

En el presente trabajo se describe la capacidad de dicho adenovirus de generar un efecto antitumoral y una respuesta inmunológica *in vivo*. Así como el análisis de la respuesta inmunológica inducida y la distribución de las partículas virales en los distintos tejidos.

ANTECEDENTES

INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL

La inmunoterapia antitumoral data de finales de los años 1800's, a partir de observar que los pacientes con infecciones activas eran menos propensos a desarrollar tumores o incluso resultaban menos afectados por estos. Esta observación, propició el aislamiento de la toxina de Coley, proveniente de *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens* para su posterior aplicación cerca de tumores sólidos (Orange et al., 2016). De sus inicios a la fecha, este enfoque terapéutico se ha ido perfeccionando conforme se genera nuevo conocimiento.

El objetivo principal de la inmunoterapia contra el cáncer consiste en desencadenar una respuesta inmune que sea específica de tumor, eficiente y duradera con la generación de células efectoras CD8+ funcionalmente activas (Hollingsworth & Jansen, 2019). La característica primordial de la respuesta de células T CD8+ es su magnitud, la cual es representada como la frecuencia de las células T específicas de antígeno que producen IFN- γ (Figura 1) (Raja et al., 2018; Seder et al., 2008).

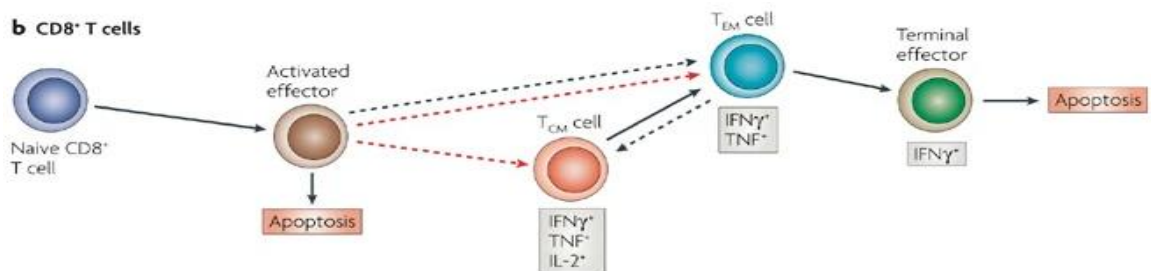


Figura 1. Modelo de diferenciación de células T CD8+ efectoras y de memoria. Se describen dos modelos para la generación de células T de memoria central CD8+ (células T_{CM}) y células T de memoria efectora CD8+ (células T_{EM}) dónde la línea punteada negra representa la «diferenciación lineal» y el «linaje fijo» está representado con flechas punteadas rojas; las flechas negras representan transiciones para ambos modelos. Seder et al., 2008.

Existen diversas proteínas que son específicas o sobre expresadas en las células tumorales, y que son utilizadas como antígenos en la terapia y/o el diagnóstico del cáncer. De manera fisiológica, el sistema inmunitario se encarga de realizar la detección y la eliminación de las células que expresan estos antígenos asociados a tumor. Sin embargo, las células cancerosas han desarrollado mecanismos para evadir dicha inmunovigilancia, tales como la selección de células que pierden la expresión de antígenos, relacionado con la disminución en la expresión de moléculas MHC (Escors, 2014), permitiendo la consecuente progresión del desarrollo tumoral.

Se describen 3 fases durante la interacción dada entre el sistema inmune y las células tumorales: Eliminación, equilibrio y escape (Figura 2) (Raja et al., 2018).

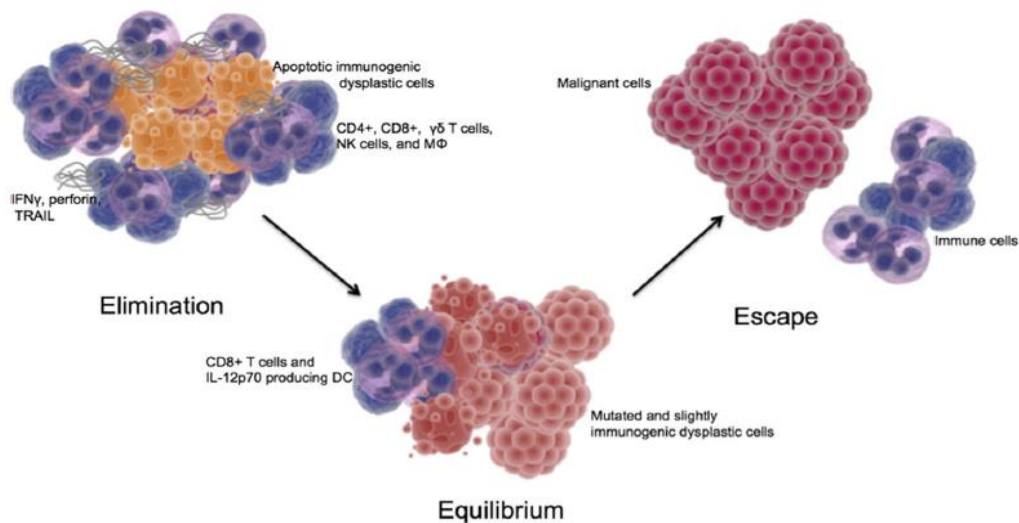


Figura 2. Fases durante la interacción entre el sistema inmune y las células tumorales. Raja et al., 2018.

La primera fase corresponde a la detección temprana de las células transformadas en la cual las células inmunes buscan su eliminación. Esta etapa inflamatoria se caracteriza por la liberación de citocinas como IFN- γ estimulando células NK, CD4+ y CD8+ que buscan concretar la muerte inmunogénica de las células tumorales a través de moléculas como las perforinas. De no lograr la eliminación de las células transformadas se acumulan mutaciones y se progresa a un estado en el cual disminuye su eliminación, dando lugar a una fase de equilibrio que culmina con la evasión del sistema inmune por parte de las células tumorales en la tercera fase de escape.

Por lo tanto, con la inmunoterapia antitumoral se pretende recuperar un mecanismo naturalmente presente en el organismo (fase de eliminación) e incluso potenciarlo en beneficio del hospedero, evitando la progresión hacia una fase de equilibrio y posteriormente de escape.

A diferencia de las infecciones, el tejido tumoral carece de un ambiente óptimo inflamatorio que permita la activación inicial del sistema inmune contra el tumor, por lo que se requiere de señales que provean un ambiente proinflamatorio, tales como cGAS-STING agonistas, citocinas y virus oncolíticos (Philip & Schietinger, 2022). Una de las estrategias para potenciar la respuesta antigénica, es asociar los antígenos a moléculas inmunoestimulantes las cuales tienen receptores de alta afinidad en células del sistema inmune, con lo que se potencia la presentación de antígenos, desencadenando una respuesta inmune antitumoral más eficiente (Mousavi et al., 2020; Srivastava et al., 2014; Velcheti & Schalper, 2016).

VIROTERAPIA ONCOLÍTICA

La viroterapia oncolítica resulta atractiva como vehículo de entrega de genes debido a su potencial de replicación selectiva en células tumorales, que culmina con la lisis de la célula cancerígena debida al proceso lítico natural de replicación viral (Wold & Toth, 2013). Dicho proceso libera detritos celulares que posteriormente son internalizados por células del sistema inmune y procesados para finalmente potenciar la respuesta inmune antitumoral (Figura 3) (Howells et al., 2017; Mantwill et al., 2021; Zhao et al., 2021).

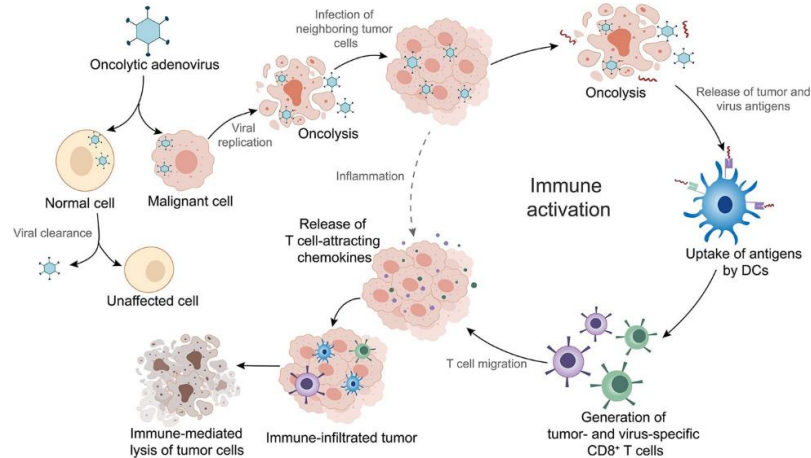


Figura 3. Replicación de los adenovirus oncolíticos en células tumorales y no tumorales. Zhao et al., 2021.

Los adenovirus destacan entre los virus oncolíticos al ser reportados como los más efectivos en mejorar la terapia mediada por células T contra tumores sólidos, al comparar diferentes vectores virales oncolíticos (Cervera-Carrascon et al., 2020). La entrega de estos virus oncolíticos por vía intratumoral ha demostrado una gran especificidad por las células tumorales, reducción de masa tumoral así como una menor tasa de efectos adversos serios, en comparación con las terapias convencionales (Raja et al., 2018).

Además, en estudios preclínicos y clínicos de fases tempranas los AdO han mostrado la capacidad de inducir una respuesta inmune antitumoral efectora de manera local y sistémica ya sea como agentes únicos o en combinación con las terapias existentes (Duan et al., 2021; Goradel et al., 2019; Huang et al., 2019).

La lisis específica de células tumorales que se reporta en los estudios clínicos está dada por la generación de adenovirus de replicación condicional; la cual se logra mediante modificaciones realizadas en los genes tempranos del genoma adenoviral, así como con la adición de promotores específicos de tumor que regulan la expresión de los genes tempranos. Dichas modificaciones incluyen deleciones que no deben interferir con la señal de empaquetamiento ni con la región de repetición terminal invertida (ITR) por sus siglas en inglés, las cuales se empalman con la región potenciadora E1A (Figura 4) (Mantwill et al., 2021).

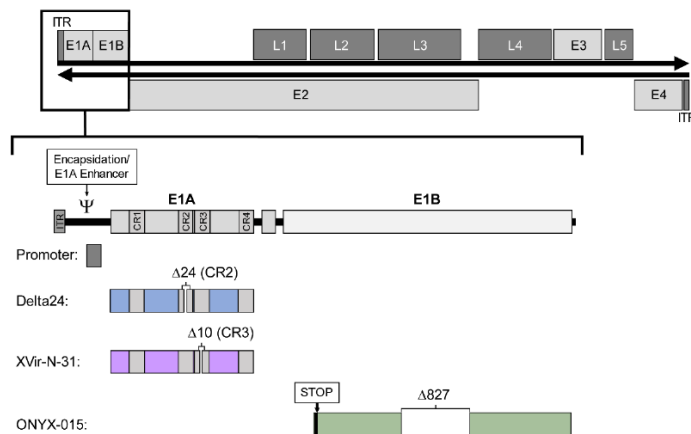


Figura 4. Modificaciones realizadas en el genoma del adenovirus 5 silvestre (WT) para hacerlo condicionalmente replicativo. El ADN de doble cadena es de aproximadamente 36 kb de longitud (flechas horizontales negras), se encuentra flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) segmentado en cuatro unidades de transcripción temprana (E1–E4, cajas grises claras) y cinco unidades de transcripción tardía (L1–L5, cajas grises oscuras). La región E1 (ampliada a continuación) consiste en la señal de encapsidación/potenciador E1A, el promotor E1A, E1A con cuatro regiones conservadas (CR1–CR4) y E1B. Los cuatro conceptos de modificación se enumeran a continuación: Cambios en el promotor (gris), Delta24 (azul) con una delección en CR2, XVir-N-31 (púrpura) con una delección en CR3 y ONYX-015 (verde) con un codón de parada y una supresión en E1B55K (Mantwill et al., 2021).

4-1BB

El receptor 4-1BB fue identificado por primera vez en ratones como una secuencia inducible de mRNA encontrada en linfocitos citotóxicos y una clona de linfocitos T cooperadores, mediante un procedimiento de cribado diferencial modificado durante la identificación de genes candidatos expresados específicamente en células T (Kwon & Weissman, 1989).

También conocido como CD137, el receptor 4-1BB pertenece a la familia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNFR) y se expresa en las membranas de las células T CD4+ y CD8+ activadas. Al activarse provee una potente señal estimuladora para las células T CD8+ y en menor medida a las células CD4+ (Zhou et al., 1995), por lo que representa un blanco prometedor para la inmunomodulación. Estructuralmente corresponde a una glucoproteína de un peso molecular de 27kDa que se induce mediante la activación linfocítica (Li & Liu, 2013; Zhou et al., 1995), su homólogo humano fue caracterizado por Alderson, et al. en 1994 y su localización cromosómica es en el locus 1p36 (Cheuk et al., 2004).

4-1BBL

La presencia de un ligando para el receptor 4-1BB se verificó por primera vez en la línea celular murina EL4 a través de su unión con una proteína de fusión 4-1BB/Fc. Posteriormente, el gen para 4-1BBL se clonó a través de un cribado proveniente de una librería de expresión de cADN de células de carcinoma embrionario (EC1) (Cheuk et al., 2004). 4-1BBL es expresado en linfocitos T activados; así como en diferentes células presentadoras de antígenos entre las

cuáles se encuentran linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (Li & Liu, 2013).

En su versión murina, m4-1BBL, es una proteína transmembrana tipo II compuesta por una región N-terminal citoplasmática y un ectodominio C-terminal separados por un dominio transmembrana. El ectodominio a su vez se divide en una cola y un dominio de homología TNF (THD), este último media la interacción con su receptor m4-1BB. Además, 4-1BBL se auto ensambla como un homodímero simétrico doble, en el que un enlace disulfuro conecta covalentemente ambos protómeros (Bitra, Doukov, Wang, et al., 2018).

La versión humana, h4-1BBL, se aisló por primera vez utilizando una proteína de fusión que consiste en la porción extracelular del receptor h4-1BB acoplada a la región Fc de la inmunoglobulina (Ig) G1 humana, para identificar y clonar el gen de h4-1BBL a partir de una clona de células T CD4+ activadas utilizando una estrategia de clonación de expresión directa. Los análisis de secuencia revelaron que h4-1BBL comprende 254 a.a. y comparte un 36% de identidad con m4-1BBL (Alderson et al., 1994).

h4-1BBL existe en forma soluble y como una proteína transmembranal tipo II previamente descrita para m4-1BBL. La región THD de h4-1BBL comparte solo el 20-25% de identidad en la secuencia con otros ligandos TNF conocidos. Sin embargo, la estructura general de h4-1BBL es como otros ligandos homotriméricos no covalentes de TNF (Bitra, Doukov, Croft, et al., 2018).

COMPLEJO 4-1BB/4-1BBL

Los protómeros m4-1BBL y h4-1BBL son estructuralmente similares y comparten detalles estructurales con los miembros de la familia TNF convencional. La principal diferencia ocurre en el ensamblaje oligomérico del ligando porque h4-1BBL forma una unidad funcional hexamérica mientras que m4-1BBL forma una unidad de señalización tetramérica (Bitra et al., 2019). Tales estructuras proporcionan información sobre las diferencias estructurales que impulsan las interacciones receptor-ligando específicas de la especie.

Dado que la multimerización y la agrupación es un requisito de condición previa para la señalización intracelular TNFR, la presentación de unidades de señalización funcionales diferenciales en humanos y ratones admite un mecanismo único de señalización 4-1BB en ambas especies (Bitra & Zajonc, 2019). Comparable a otros miembros de la familia TNF, la interacción ligando-receptor ocasiona la oligomerización del 4-1BB, reclutando TRAFs triméricos intracelulares (TRAF1 y TRAF2), que conducen a la estimulación de NF- κ B y fosfatidilinositol 3-quinasa, vías de señalización proinflamatorias mediadas por Akt (Zapata et al., 2018).

SA-4-1BBL

4-1BBL en su forma soluble como molécula trimérica carece de actividad biológica (Rabu et al., 2005). Con el fin de dar estabilidad al trímero se generó una proteína quimérica SA-4-1BBL soluble que consiste en la fusión del dominio extracelular de 4-1BBL al C-terminal del núcleo de la SA; tal molécula existe como tetrámeros y oligómeros debido a las características estructurales de SA y puede

unirse a receptores 4-1BB, que son capaces de inducir una potente activación de células T CD4+ y CD8+ (Schabowsky, Sharma, et al., 2009). Esta forma soluble del ligando 4-1BB ha demostrado ser un mejor inmunoestimulante con menos efectos adversos que el anticuerpo monoclonal agonista del receptor 4-1BB (Schabowsky, Elpek, et al., 2009).

Recientemente se ha demostrado una característica inesperada de SA-4-1BBL, además del efecto conocido en células CD8+ T efectoras y respuesta de memoria, se encontró una activación no específica de células T CD4+ y células NK, que exhibieron protección contra el desafío tumoral (Barsoumian et al., 2019), representando un puente entre respuesta inmune innata y adaptativa (Figura 5) (Martinez-Perez et al., 2021).

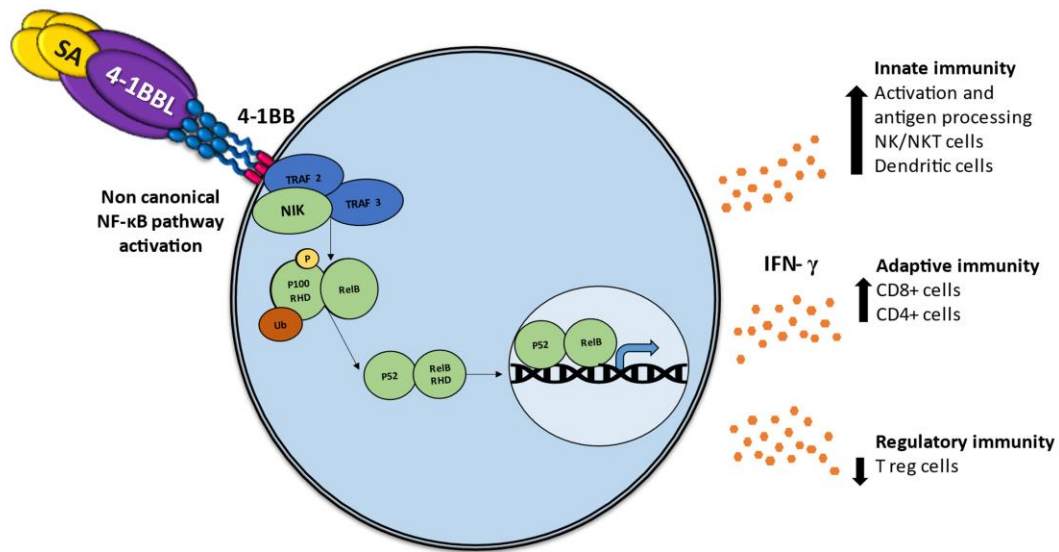


Figura 5. Vía de señalización intracelular activada por el adyuvante SA-4-1BBL. La activación de la vía no canónica de NF-κB por SA-4-1BBL a través del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) 4-1BB, comprende la activación lenta y persistente de la quinasa inductora de NF-κB (NIK), la fosforilación de p100 mediada por NIK y el posterior procesamiento nuclear y translocación de p100, p52 y RelB, con la consiguiente producción de interferón gama (IFN-γ), desencadenando efectos pleiotrópicos sobre la respuesta inmune. Martinez-Perez et al., 2021.

Clásicamente, un subtipo de ligandos de la familia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNFR) induce la vía no canónica de NF- κ B en inflamación e inmunidad (McPherson et al., 2012).

Además de las funciones ya conocidas de la vía de señalización de NF- κ B, las cuales incluyen la regulación del desarrollo de los órganos linfoides, sobrevivencia y maduración de células B (Dejardin, 2006; Sun, 2012); existe un rol importante en la regulación y maduración de células dendríticas. Al utilizar ratones deficientes en NF- κ B, RelB, RelC o ambos y NF- κ B1, se destaca que las células dendríticas requieren RelB para inducir una respuesta de células T ya sea por la vía convencional de presentación de antígenos o vía presentación cruzada (Gerondakis et al., 2006; Seki et al., 2015; Sun, 2017), lo cual implica un rol esencial en la respuesta inmune antitumoral.

En contraste con la activación rápida y transitoria de la vía canónica NF- κ B, la activación de la vía no canónica es característicamente lenta y persistente (Sun, 2017), lo cual implica mayor especificidad. Existen reportes de vacunas que utilizaron SA-4-1BBL fusionado al antígeno E7 del VPH-16 y generaron una potente respuesta Th1 y de células T citotóxicas mediante el incremento de células de memoria CD4+ y CD8+, mejorando la proliferación de células T, muerte celular y liberación de citocinas Th1, lo cual se traduce en mayor sobrevivencia de los modelos murinos (Garza-Morales et al., 2019; Sharma, Srivastava, et al., 2010; Srivastava et al., 2012, 2014).

Específicamente un modelo *in vivo* de cáncer tratado con una vacuna de ADN que codifica PS-SA-E7-4-1BBL mostró un incremento antígeno-específico de IFN- γ asociado con la eliminación de la masa tumoral (Garza-Morales et al., 2019). Además, se ha encontrado una disminución de células Treg tras la administración de una vacuna con SA-4-1BBL y el agonista Monofosforil lípido A (MPL) en un modelo de tumor TC-1 con la cepa murina C57BL/6 (Srivastava et al., 2012).

4-1BBL EN ESTUDIOS CLÍNICOS Y PRECLÍNICOS

El uso del inmunoestimulante SA-4-1BBL en estudios preclínicos ha demostrado tener un potente efecto antitumoral profiláctico y terapéutico en diversos modelos murinos tumorales. Entre los hallazgos a destacar en dichos modelos se encuentra la inducción de una respuesta inmune antitumoral, la cual es específica, duradera y coexiste con el incremento en la producción de IFN- γ (Barsoumian et al., 2019; Garza-Morales et al., 2019; Srivastava et al., 2014). Además de la inducción de un ambiente proinflamatorio, el cual es detectado mediante la liberación de citocinas Th1, se ha encontrado una disminución de las células supresoras (CD4+ Foxp3+ Treg) (Srivastava et al., 2012). En la tabla 1 se resumen los principales hallazgos en estudios preclínicos con 4-1BBL (Martinez-Perez et al., 2021).

Tabla 1. SA-4-1BBL en estudios preclínicos

Enfoque	Hallazgos	Vía de señalización inmune	Año, (ref.)
Vacuna de ADN en un modelo murino de cáncer cervical	Efecto profiláctico y terapéutico en contra de tumores TC-1 establecidos	Incremento de células T específicas de antígeno E7 productoras de IFN- γ	2019, (Garza-Morales et al., 2019, p.)
Vacuna de subunidades proteicas en un modelo murino con tres diferentes tipos de tumor	Protección contra reto tumoral con monoterapia, independiente del tipo tumoral, y prevención de recurrencias	Células T CD4+ productoras de IFN- γ y células NK como predictor de protección tumoral. IFN- γ requerido como mediador entre ambas poblaciones celulares	2019, (Barsoumian et al., 2019)
Vacuna proteica basada en el uso de AAT, un sistema adyuvante SA-4-1BBL y MPL en un modelo de cáncer inducido por VPH	Erradicación de tumores TC-1 establecidos. Control de la progresión de metástasis pulmonar. Ausencia de autoinmunidad y toxicidad clínica detectable	Generación de una respuesta periférica de células T CD8+. Ratio CD8+/CD4+ Treg intratumoral favorable. CD8+ e IFN- γ críticos en la eficacia terapéutica	2014, (Srivastava et al., 2014)
Vacuna de subunidades proteicas en modelo murino de carcinoma pulmonar	Erradicación de tumores 3LL en murinos	Respuesta celular efectora asociada con células CD8+ y NK. Donde las células CD8+ juegan un papel crítico y las células NK un papel moderado pero significativo en la eficacia de la vacuna	2012, (Srivastava et al., 2012)
Vacuna a base de proteínas en un modelo murino de cáncer cervical	Erradicación de tumores TC-1 establecidos y generación de una respuesta de memoria tumor-específica y duradera	Generación de una respuesta primaria de células T, así como proliferativa y efectora. Células de memoria a largo plazo CD8+ y CD4+ intratumorales	2010, (Sharma, Srivastava, et al., 2010)

A la fecha no existen reportes de SA-4-1BBL en fases clínicas, sin embargo, se cuenta con información respecto al uso del adyuvante 4-1BBL en estudios clínicos de diferentes fases y administrado a través de diferentes vectores, los cuales se resumen en la tabla 2. En general, dichos estudios han demostrado la presencia de células T específicas de tumor, tanto de memoria como efectoras; así como una buena tolerancia con efectos secundarios tales como fiebre, escalofrío, náusea y elevación de transaminasas.

Tabla 2. 4-1BBL en estudios clínicos

Estudio clínico	Año; fase.
Estudio abierto, multicéntrico, multidosis, primero en humanos de RTX-240 para el tratamiento de pacientes con R/R recidivante/refractario o tumores sólidos localmente avanzados. RTX-240 es una terapia celular que co expresa 4-1BBL e IL-15TP, una fusión de IL-15 y receptor alfa de IL-15 como monoterapia.	2020; I, II
Estudio de DSP107 en sujetos con tumores sólidos avanzados, incluido un estudio de seguridad de aumento de dosis (parte 1) y una evaluación preliminar de la eficacia de DSP107 como monoterapia y en combinación con atezolizumab (parte 2). DSP107 (SIRP α -4-1BBL) es una proteína de fusión trimérica bifuncional.	2020; I, II
LOAd703 en combinación con atezolizumab en melanoma maligno. LOAd703 es un adenovirus oncolítico que codifica (TMZ)-CD40L y 4-1BBL trimerizado unido a membrana.	2019; I, II
Estudio abierto para evaluar la seguridad, la farmacocinética y la actividad antitumoral preliminar de RO7227166 (un ligando 4-1BB dirigido a CD19) en combinación con obinutuzumab y en combinación con glofitamab después de una dosis previa al tratamiento de obinutuzumab administrada en participantes con linfoma no Hodgkin de células B recidivante/resistente al tratamiento.	2019; I
Evaluación del efecto de LOAd703 en pacientes con cáncer de páncreas, cáncer biliar, cáncer de ovario y cáncer colorrectal. LOAd703 es un adenovirus oncolítico del serotipo 5/35 que codifica el transgén inmunoestimulante: TMZ-CD40L y 4-1BBL.	2017; I, II
Evaluación del efecto de un receptor de antígeno quimérico (CAR) modificado con células T modificadas EGFRt/19-28z/4-1BBL dirigidas a CD19 en pacientes con neoplasias malignas hematológicas CD19+ recidivantes o refractarias.	2017; I
Evaluación de la seguridad de LOAd703, un adenovirus oncolítico para el cáncer de páncreas. Delolimogene mupadenorepvec virus oncolítico que codifica TMZ-CD40L y 4-1BBL.	2016; I, II
Vacuna alogénica modificada para expresar el ligando HLA A2/4-1BB para pacientes con melanoma de alto riesgo o bajo residual.	2013; I, II

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible generar una respuesta antitumoral antígeno-específica usando un adenovirus oncolítico PS-SA-E7-4-1BBL?

JUSTIFICACIÓN

La forma soluble del ligando 4-1BB (SA-4-1BBL) produce efectos pleiotrópicos al interactuar con su receptor 4-1BB en células del sistema inmune innato, adaptativo y regulatorio.

Recientemente en nuestro grupo de trabajo, se realizó una fusión génica del adyuvante SA-4-1BBL y el antígeno E7 en un solo gen, la cual al administrarse mediante biobalística mostró un efecto antitumoral en un modelo murino de cáncer que expresa el antígeno E7 del VPH 16.

Debido a que los adenovirus constituyen uno de los sistemas más eficientes de entrega de genes *in vivo*, y que los adenovirus oncolíticos son capaces de replicarse únicamente en células tumorales, diseñamos y caracterizamos un adenovirus oncolítico que expresa la fusión génica PS-SA-E7-4-1BBL y posee un efecto antitumoral con lisis específica hacia células tumorales *in vitro*. En este trabajo se propone analizar el efecto antitumoral del adenovirus *in vivo*, esperando que los resultados nos permitan establecer las bases para una terapia con mayor eficacia antitumoral.

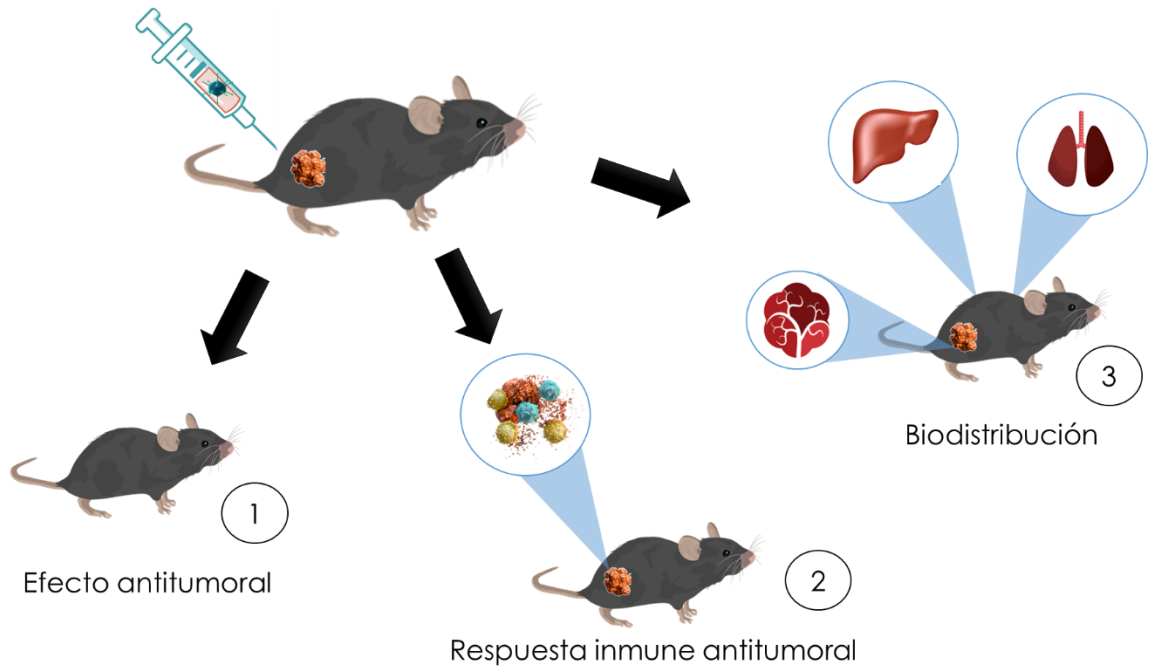
HIPÓTESIS

El adenovirus oncolítico PS-SA-E7-4-1BBL confiere un efecto antitumoral *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto antitumoral del adenovirus oncolítico PS-SA-E7-4-1BBL en un modelo *in vivo*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto antitumoral profiláctico y terapéutico del adenovirus oncolítico.
2. Evaluar la respuesta inmune inducida por la inmunización con el adenovirus oncolítico.
3. Analizar la distribución y seguridad del uso del adenovirus oncolítico.

MATERIALES

CONSTRUCCIÓN GÉNICA PS-SA-E7-4-1BBL

La secuencia PS-SA-E7-4-1BBL incluyendo la optimización de codones y los sitios de restricción, se diseñó previamente en nuestro laboratorio y se sintetizó por GenScript (Piscataway, NJ, USA). Para realizar la construcción génica se utilizó el gen doble mutante (E7dm) no oncogénico del VPH-16 fusionado al núcleo de la estreptavidina (SA) y a la secuencia del dominio extracelular de m4-1BBL, utilizando linkers (GlySer)³. En el extremo N-terminal se añadió el péptido señal (PS) de la calreticulina (CRT) humana.

ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS RECOMBINANTES

Los adenovirus recombinantes fueron sintetizados por O.D. 260 Inc (Boise, ID, USA). El adenovirus oncolítico consta de una delección de 24 pares de bases ($\Delta 24$) en la región conservada 2 (CR2) de E1A; una delección de 1222 pares de bases *BglII-MfeI* en la región E3, en la cual se preservaron los genes E3 ADP, RID α , RID β y 14.7K; el gen que codifica para una fibra híbrida Ad5/3, y entre dicha secuencia y la región E4, un casete de expresión CMV-(PS)-SA-E7-4-1BBL-SV40pA.

LÍNEAS CELULARES

TC-1 (CRL-2785, ATCC, descontinuada): Células tumorales derivadas de células epiteliales de pulmón de ratón de la cepa C57BL/6, co-transformadas con las oncoproteínas del VPH-16 E6/E7 y los oncogenes c-Ha-Ras.

ANIMALES DE LABORATORIO

Ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad (Círculo ADN, México). Posterior a su llegada fueron aclimatados durante una semana y se mantuvieron bajo ciclos de 12h de luz/oscuridad, con acceso a agua y alimento *ad libitum*, se mantuvieron en jaulas transparentes con encamado de aserrín y una temperatura de entre 25-28°C. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los lineamientos para el cuidado de animales (NIH Publications No. 8023, revisado 1978). Así mismo el estudio fue analizado y aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL, con el número de registro HT18-00002.

ANTICUERPOS

Anticuerpo monoclonal murino Anti-hexón (3G0): (sc-80671, Santa Cruz Biotechnology)

Anticuerpo policlonal de cabra IgG Anti-Ad5-hexón conjugado con FITC (PA1-73053, Thermo Fisher Scientific)

Anticuerpo policlonal de cabra IgG Anti-CXCR-3 (sc-6226, Santa Cruz Biotechnology) discontinuado

Anticuerpo policlonal de conejo IgG Anti-CD8- α (sc-7188, Santa Cruz Biotechnology)

Anticuerpo policlonal de conejo IgG Anti-CXCR-1 (sc-82424, Santa Cruz Biotechnology) discontinuado

Anticuerpo secundario biotinilado pan específico IgG Anti-ratón/conejo/cabra (PK-7800, Vector Laboratories)

MEDIOS DE CULTIVO

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

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

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

Glutamina: GlutaMAX (35050-061, Gibco)

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

Mercaptoetanol (21985023, Gibco)

Piruvato (11360070, Gibco)

REACTIVOS

Agua bidestilada (Laboratorios Monterrey)

Azul de tripano (15250061, Gibco)

CBA Mouse Th1/Th2/Th17 kit (560485, BD Biosciences)

Etanol (CTR)

Fast SYBR™ Green Master Mix (4385612, Thermo Fisher Scientific)

Hematoxilina y eosina (H&E) (H3136 and E6003; Sigma-Aldrich)

NucleoSpin Tissue Mini kit (740952.50; Macherey-Nagel)

Tripsina (9002-07-7, Gibco)

SOLUCIONES

Buffer TBS 10X: 308 g de NaCl, 43.35 g de Tris-Base y aforar a 3 L de agua bidestilada

Buffer TBST 1X: 100 mL de TBS 1X, 900 mL de agua bidestilada y 500 µL de Tween-20

PBS 10X: 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 4.4 g de Na₂HPO₄, 2.4 g de KH₂PO₄ y
aforar a 1 L de agua bidestilada a un pH 7.4

PBS 1X: 100 mL de PBS 10X y 900 mL de agua bidestilada

CONSUMIBLES

Cajas de cultivo celular de 75 cm² y 25 cm² (Corning)

Criotubos de 2 mL (Corning)

Espátulas de plástico (Corning)

Jeringas de insulina 0.5 mL (BD Ultrafine)

Matraces de 1000 mL y 250 mL (Kimax)

Pipetas serológicas 10 mL y 5 mL (Corning)

Pipetor para cultivo celular (Labnet)

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

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

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

Tubos eppendorf de 1.7 mL y 600 µL (Costar y Corning)

Tubos falcón de 50 mL y 15 mL (Corning y ThermoScientific)

EQUIPO DE LABORATORIO

Autoclave (FE-397, Felisa)

Balanza analítica (GR-120, AND)

Baño de perlas para cultivo celular (74300-714, LabArmor)

Cámara de electroforesis para geles de poliacrilamida (Mini-Protean, Bio-Rad)

Cámara de Neubauer (BBC, Propper)

Campana de flujo laminar nivel II (UN-425-400, LabGard)

Centrífuga para tubos eppendorf (A1-15K, Sigma)

Centrífuga para tubos falcón (Sorval STR 16R, ThermoScientific)

Citómetro Accuri C6 (BD Biosciences)

Espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf)

Espectrofotómetro NanoDrop Lite (ND-LITE-PR, Thermo Fisher Scientific)

Estereomicroscopio Leica

Fuente de poder (300 Plus, Labnet)

Incubadora de CO₂ para cultivo celular (370, ThermoElectronCorporation)

Incubadora refrigerada (LM-570, MRC)

Lector de placas ELISA (iMARK, Bio-Rad)

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

Microplaca de ELISpot (EL485, R&D Systems)

Microscopio de Fluorescencia Leica

Microscopio invertido (9804439, Southern Precision Instrument)

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

Software para gráficas y análisis estadísticos (GrapPadPrism 6)

StepOne Real-Time PCR System (4376357, Applied Biosystems)

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

Vernier digital (Truper)

Vórtex (Genie 2, Daigger & CO, Inc.)

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

El presente estudio requirió de medidas de bioseguridad nivel 2 debido al uso de adenovirus recombinantes, clasificándose como Grupo de riesgo 2 conforme al Manual de Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos 5ª Edición 2007, CDC/NIH. Tales medidas se refieren al uso de una campana de bioseguridad nivel 2 y autoclave.

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

La manipulación de los animales de laboratorio se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Así mismo utilizando el equipo de protección personal antes mencionado, por el riesgo de mordeduras y salpicaduras. El sacrificio y aislamiento de muestras provenientes de los murinos se realizó en campana de bioseguridad en condiciones de esterilidad.

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

METODOLOGÍA

ENSAYOS ANTITUMORALES PROFILÁCTICO Y TERAPÉUTICO

Se utilizaron dos ensayos antitumorales, uno terapéutico y uno profiláctico. El modelo murino ampliamente utilizado (Sadraeian et al., 2013; Sharma, Schabowsky, et al., 2010) es con la cepa murina C57BL/6, a la cual se le realiza un implante subcutáneo con la línea tumoral TC-1 (ATCC, CRL-2785), una línea epitelial singénica a la cepa murina que no es rechazada por el hospedero. Además, el origen de esta línea tumoral deriva de su transformación por la integración genómica y expresión de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16, simulando las células presentes durante el desarrollo de un CaCu por infección por el VPH-16.

Se utilizaron ratones hembra de 6 a 8 semanas de la cepa C57BL/6 para evaluar el efecto antitumoral de los adenovirus recombinantes, los cuales fueron distribuidos en los siguientes grupos (n=5):

1. PBS (Control negativo sin adenovirus)
2. Adenovirus negativo a antígeno, expresando proteína PS-SA-41BBL (AdO)
3. Vacuna de ADN como control de referencia, expresando proteína PS-SA-E7-41BBL (ADNE7)
- 4.- Adenovirus positivo a antígeno expresando proteína PS-SA-E7-41BBL (AdOE7)

ENSAYO TERAPÉUTICO

Para el ensayo terapéutico se realizó la inoculación de 5×10^4 células tumorales TC-1 (resuspendidas en 100 μ l en PBS 1X pH 7.4) en el flanco derecho vía subcutánea. Catorce días después del implante de las células (observando el desarrollo tumoral $\geq 100 \text{ mm}^3$), se administró la primera inmunización con los adenovirus recombinantes (2.5×10^8 UI) en 20 μ l vía intratumoral. Una semana después de la primera inmunización se aplicó la segunda inmunización con la misma cantidad y vía de administración de la primera. Como control negativo se administraron 20 μ l de PBS 1X vía intratumoral. Como control de referencia se administró la vacuna de ADN mediante biobalística con el sistema helios gene gun (1 μ g de ADN) sobre la piel afeitada del abdomen, en un total de 2 dosis, 1 por semana.

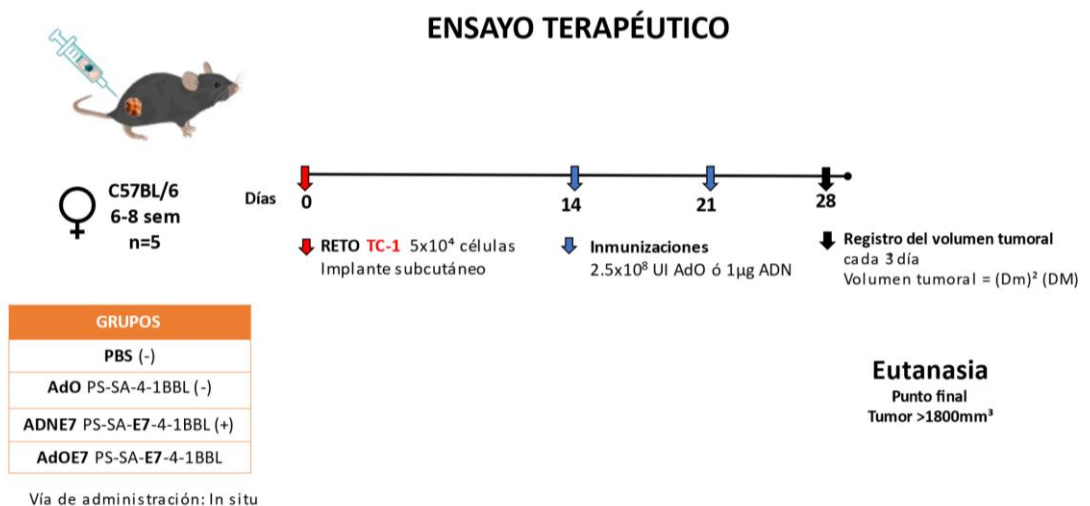


Figura 6. Esquemización del ensayo terapéutico.

ENSAYO PROFILÁCTICO

Para el ensayo profiláctico se administraron 2 inmunizaciones con los adenovirus recombinantes (2.5×10^8 UI) vía intraperitoneal, la primera en el día 0 y la segunda una semana después. A los 7 días de la segunda inmunización se realizó la inoculación de 5×10^4 células tumorales TC-1 (resuspendidas en 100 μ l en PBS 1X pH 7.4) en el flanco derecho vía subcutánea. En ambos ensayos se midió el ancho y largo del tumor cada tercer día con ayuda de un vernier y se graficó el volumen del tumor, el cual se calculó con la fórmula: $(\text{Diámetro menor})^2 (\text{Diámetro mayor}) / 2$ (Jensen et al., 2008) . La fecha de muerte o sacrificio de los ratones se graficó para comparar la sobrevida en los distintos tratamientos.

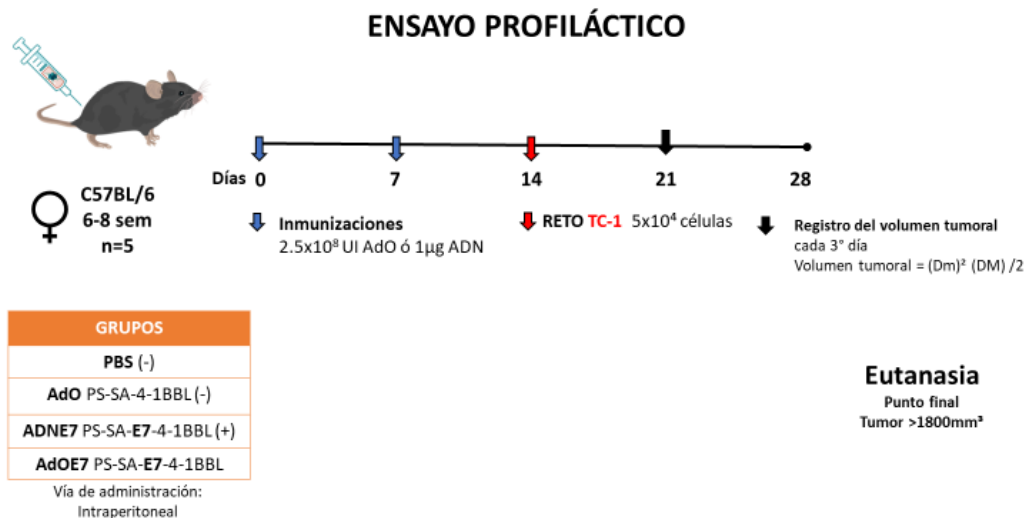


Figura 7. Esquemización del ensayo profiláctico.

Los grupos de ratones que no presentaron desarrollo tumoral fueron sometidos a un segundo reto tumoral. Al día 47 desde el primer reto tumoral se implantaron con 5×10^4 células tumorales TC-1 (resuspendidas en 100 μ l en PBS 1X pH 7.4) en el flanco izquierdo vía subcutánea; además se añadió un grupo control de

implante (n=3) de 20 semanas de edad. Se registró el crecimiento tumoral cada tercer día, finalizando el seguimiento en el día 90 desde el primer reto tumoral.

Para evaluar la dosis mínima necesaria que confiere un efecto protector, se administraron diluciones seriadas en factor de 10 del AdOE7 en un modelo profiláctico. Los ratones se distribuyeron en los siguientes grupos de dosis (n=4): 2.5×10^5 UI, 2.5×10^6 UI, 2.5×10^7 y 2.5×10^8 , se realizó el implante tumoral y se midió el desarrollo tumoral en función del tiempo, concluyendo el día 28 post reto.

ENSAYO DE RESPUESTA INMUNE

Se utilizaron hembras C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad (n=5), utilizando los 4 grupos experimentales anteriormente descritos, los cuales fueron inmunizados con 2.5×10^8 UI del adenovirus correspondiente, por vía intraperitoneal o 1 μ g de ADN mediante biobalística sobre la piel afeitada del abdomen en dos ocasiones (Día 0 y día 7). Diecinueve días después de la última inmunización (día 26) los murinos fueron anestesiados con ketamina y xilacina (160 mg/kg y 30mg/kg) y sacrificados por dislocación cervical.

Se colectó el bazo de cada ratón y se maceró de forma individual a través de un strainer de 70 μ m, la suspensión celular se incubó en 1 mL de buffer de lisis de eritrocitos por 1 min, seguido por la inactivación con 6 mL de RPMI 1640 sin suplementar. Los esplenocitos de cada grupo experimental se agruparon e incubaron durante la noche en medio RPMI a 4 °C para reducir la lisis celular espontánea durante los ensayos subsecuentes.

ENSAYO RESPUESTA INMUNE

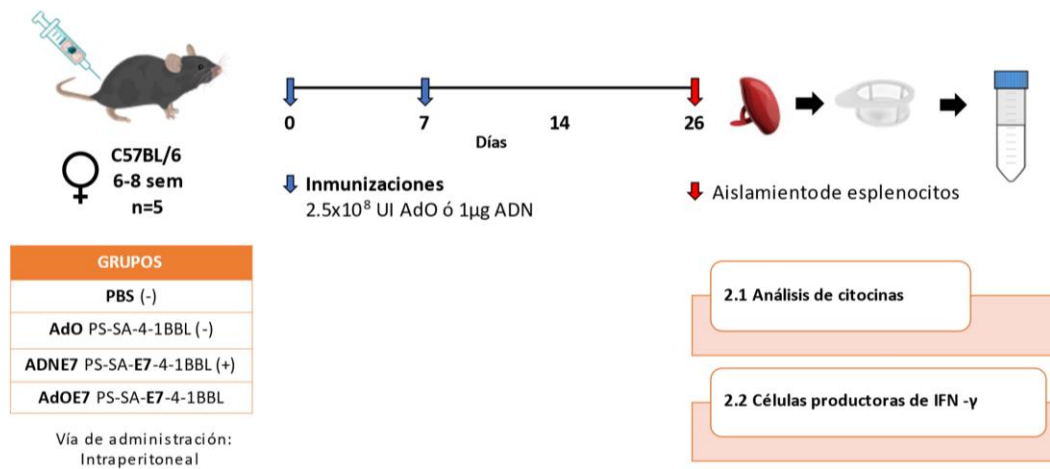


Figura 8. Esquemización del ensayo de respuesta inmune.

CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS (TH1, TH2, TH17)

Para realizar el análisis de citocinas secretadas en respuesta a la estimulación antigénica, se obtuvieron células mononucleares a partir de esplenocitos utilizando el protocolo Ficoll-Paque (GE Healthcare Biosciences, Marlborough, MA, USA). Las células mononucleares, (1×10^6) se cultivaron en una placa de 24 pocillos y se incubaron en presencia o ausencia del epítipo E7 (RAHYNIVTF, aminoácidos 49-57; GenScript, Piscataway, NJ, EUA) durante 72 h a 37°C con 5% de CO₂. Se colectaron los sobrenadantes para su posterior análisis utilizando el kit CBA Mouse Th1 / Th2 / Th17 (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La adquisición de los datos se realizó usando un citómetro Accuri C6. Se incluyeron controles sin estimulación con el epítipo E7 los cuales fueron sustraídos durante el análisis de los datos.

ELISPOT IFN- γ

Para la detección de células secretoras de IFN- γ en respuesta a la estimulación con el epítipo E7, se cultivaron esplenocitos (1×10^6 células por pocillo) en una placa de ELISPOT IFN- γ murino (EL485, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) y se estimularon durante 5 días con epítipo del antígeno E7 $1 \mu\text{g/ml}$ (RAHYNIVTF, aminoácidos 49-57; GenScript, Piscataway, NJ, EUA). La placa se procesó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La imagen de cada pocillo se documentó utilizando una cámara Micropublisher 5.0 RTV (Q Imaging, Surrey, BC, Canadá) en un microscopio estereoscópico (Leica, Buffalo Grove, IL, EUA). El conteo de señales se realizó utilizando el contador de células ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MA, EUA). Los esplenocitos no estimulados se utilizaron como controles para determinar los niveles basales de IFN- γ .

ENSAYO DE DISTRIBUCIÓN Y SEGURIDAD

Se utilizaron 3 murinos hembra C57BL/6 por grupo de 6-8 semanas de edad, a las cuales se les realizó el implante de la línea tumoral TC-1 antes descrito; al momento de alcanzar un volumen tumoral de 100 mm^3 se inmunizaron con 2.5×10^8 UI de los adenovirus correspondientes, por vía intratumoral, dosis única. Se colectaron los tejidos (hígado, pulmón y tumor) a los días 0, 2 y 7 posterior a la inmunización para ser procesados por la técnica histológica convencional y realizar la tinción de hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica anti-hexón. La mitad de la muestra se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su posterior procesamiento para qPCR.

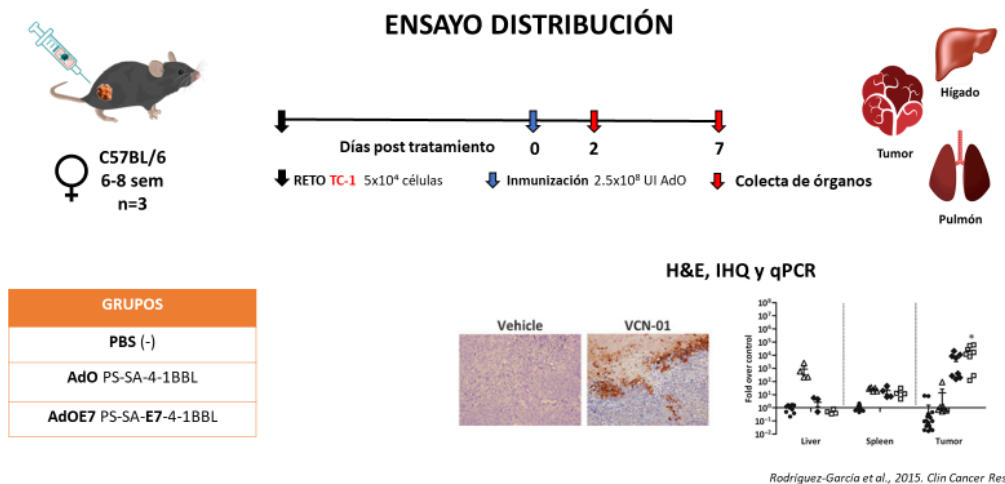


Figura 9. Esquematación del ensayo de distribución

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizó fijación de los tejidos con PFA 4%, seguido de la deshidratación y aclaramiento en un procesador de tejidos automatizado y finalmente la inclusión en parafina. Se realizaron los cortes histológicos de 4 μ m, fueron desparafinizados en xilol y rehidratados en soluciones etanólicas de concentración descendente. Después se realizó la recuperación de antígenos con buffer Citrato de Sodio 10mM, 0.05% Tween 20, pH 6; se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena usando H_2O_2 3%, y el bloqueo de proteínas usando suero de caballo 3%. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-hexón (sc-08671) a una dilución de 1:300; CD8 α (sc-7188) 1:250; CXCR-1 (sc-82424) 1:200; CXCR3 (sc-6226) 1:200; mientras que el anticuerpo secundario consistió en el uso del Kit amplificador de señal: Vectastain Quick Kit Peroxidase RTU (Vector Laboratories). Se realizó la contratincción nuclear con el colorante verde de metilo al 2% y el análisis de las preparaciones se realizó en un microscopio de campo claro Primo Star (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA).

TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA

Se realizaron los cortes histológicos de 4 μm y fueron desparafinizados en xilol y rehidratados en soluciones etanólicas de concentración descendente para la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) (H3136 y E6003; Sigma-Aldrich; Merck Millipore), seguido de la deshidratación y montaje utilizando el medio de montaje Entellan (#17960; Merck Millipore). Los cortes fueron analizados mediante microscopia de campo claro.

PCR cuantitativa (qPCR)

Se homogenizaron los tejidos previamente congelados y posteriormente se realizó la extracción de ADN total con el kit NucleoSpin Tissue Mini kit for DNA from cells and tissue (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ADN purificado, se cuantificó utilizando un NanoDrop Lite Spectrophotometer (ND-LITE-PR; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) y se ajustó a una concentración final de 25 ng/ μL . La reacción se realizó con 100 ng de ADN, utilizando los primers para Hexon FW 5'-CGCTGGACATGACTTTTGAG-3' y RV 5'-GAACGGTGTGCGCAGGTA-3'; actina FW 5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG-3' y RV 5'-ATGTCACGCACGATTTCC3'; y el Master Mix Maxima SYBR Green/ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific Inc.) en el equipo a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La cuantificación se realizó mediante una curva estándar de diluciones seriadas del AdO de concentración ya conocida cuantificada por el método TCID₅₀/mL (Figura 10).

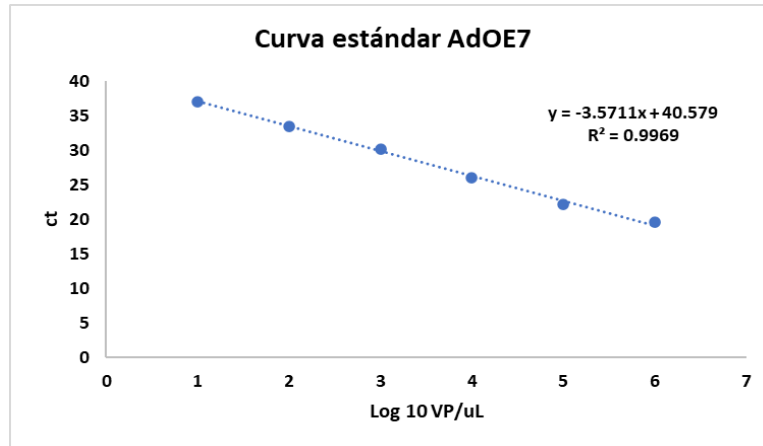


Figura 10. Curva estándar de concentración viral de stock AdOE7. A partir de un stock viral de concentración conocida (TCID₅₀/ml) se realizaron diluciones seriadas en factor de 10 para la realización de la curva estándar de concentración viral.

RESULTADOS

EFFECTO ANTITUMORAL TERAPÉUTICO DEL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO

Primero se evaluó la capacidad antitumoral de los adenovirus recombinantes, ya que la terapia con adenovirus es uno de los sistemas más eficientes de entrega de genes *in vivo*, además con el potencial oncolítico representan una buena alternativa para obtener una vacuna con una mayor eficacia antitumoral.

Se utilizaron ratones hembra de 6 a 8 semanas de la cepa C57BL/6, a los cuales se les realizó el implante de células tumorales TC-1 en el flanco derecho vía subcutánea. Al detectar el desarrollo tumoral a los 14 días después del implante, se distribuyeron en los siguientes grupos según el tratamiento administrado (n=5): PBS (Control negativo sin adenovirus); Adenovirus expresando proteína PS-SA-41BBL (AdO); Vacuna de ADN expresando proteína PS-SA-E7-41BBL (ADNE7); Adenovirus expresando proteína PS-SA-E7-41BBL (AdOE7). El crecimiento del tumor se monitorizó tres veces por semana.

La fecha de muerte o sacrificio de los ratones se graficó para comparar la sobrevivencia en los distintos tratamientos. Para el análisis de supervivencia, todos los ratones portadores de tumores fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron 1800 mm³ en volumen tumoral o antes si se encontraba ulceración o los ratones mostraban dos o más criterios de eutanasia, con base a la evaluación de la severidad de los indicadores de dolor.

Los resultados del ensayo terapéutico muestran que, para el día 10 después de la primera dosis de tratamiento existe un retraso del crecimiento tumoral en

ratones que fueron inmunizados con PS-SA-E7-4-1BBL (AdOE7) ($p \leq 0.0001$) y PS-SA-E7-4-1BBL (ADNE7) ($p \leq 0.001$) en comparación con el control negativo (Figura 11). Simultáneamente todos los sujetos de los grupos control PBS y AdO murieron, mientras que los grupos con la fusión génica AdOE7 y ADNE7 mantuvieron 100% de supervivencia (Figura 12). Desde este punto y hasta el final del estudio (día 28) no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos que recibieron la fusión génica con el antígeno E7 ($p = 0.4910$).

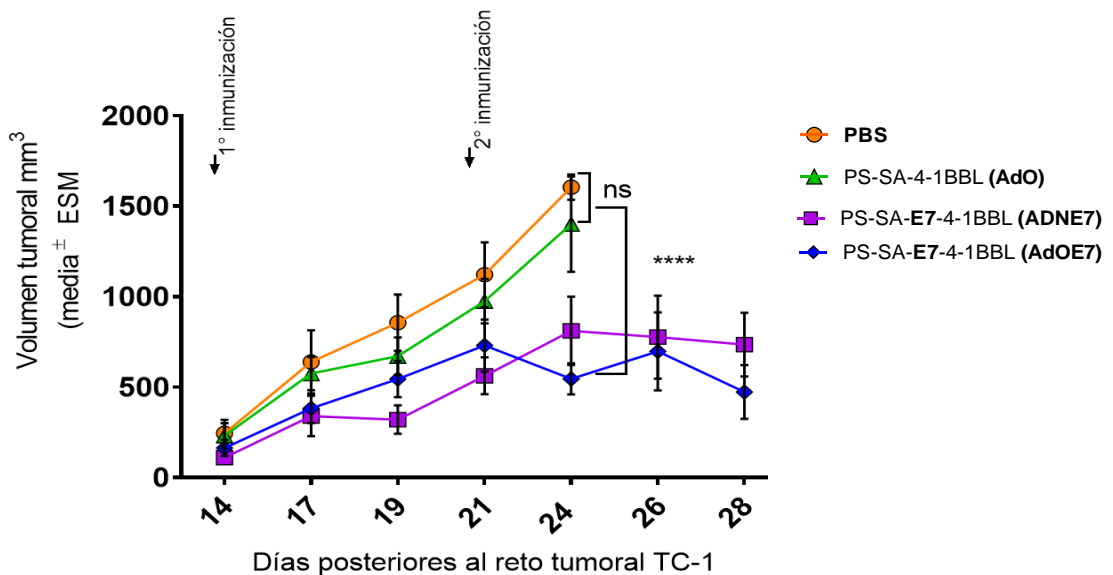


Figura 11. Efecto antitumoral terapéutico *in vivo*. Evaluación del desarrollo tumoral tras la primera y segunda inmunización, catorce días posteriores al implante tumoral. Ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad se distribuyeron en 4 grupos de tratamiento (n=5) PBS (sin adenovirus); AdO (adenovirus expresando la fusión génica sin E7); ADNE7 (recibió la construcción génica PS-SA-E7-4-1BBL mediante biobalística); AdOE7 (recibió el adenovirus oncolítico con la fusión génica con E7). A excepción del grupo ADN las inmunizaciones se administraron vía intratumoral en dos ocasiones (una por semana) la dosis de AdO fue de 2.5×10^8 UI en 20 μ l. El volumen tumoral es representado como media \pm ESM (error estándar). Se aplicó eutanasia cuando el volumen tumoral superó los 1800 mm³ o se cumplieron los criterios de punto final. El análisis estadístico fue por ANOVA de 2 vías con una prueba post-hoc de Tukey. **** $p < 0.0001$.

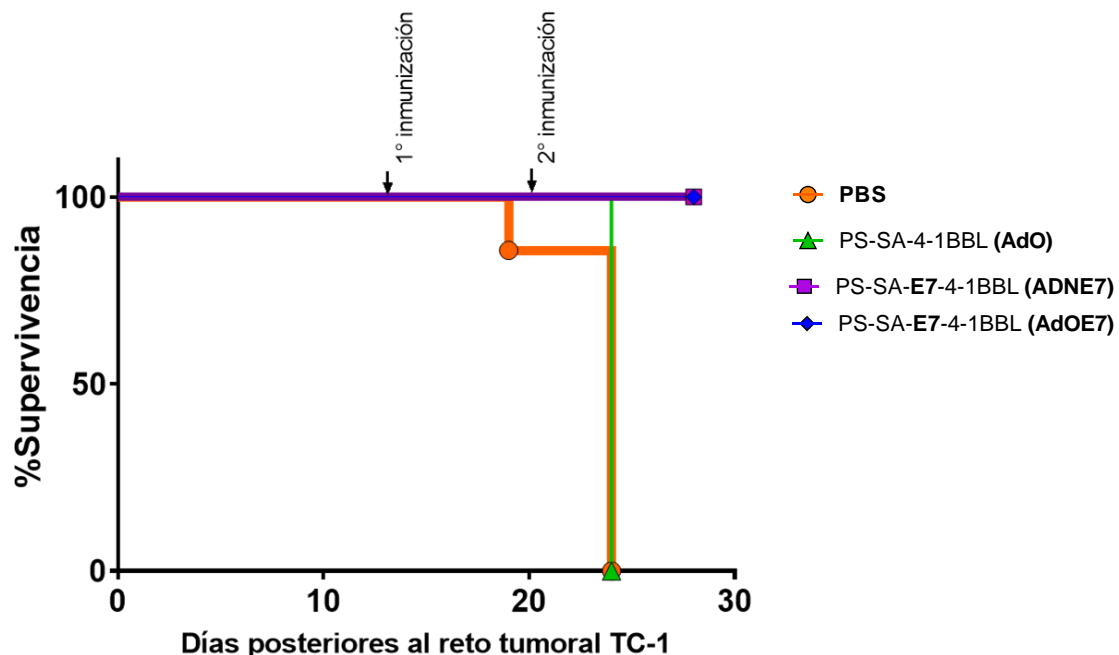


Figura 12. Sobrevida de los murinos del ensayo terapéutico. Sobrevida de los murinos tras la administración de los diferentes tratamientos: PBS (sin adenovirus); AdO (adenovirus expresando la fusión génica sin E7); ADNE7 (recibió la construcción génica PS-SA-E7-4-1BBL mediante biobalística); AdOE7 (recibió el adenovirus oncolítico con la fusión génica con E7). 1° inmunización a los catorce días post implante tumoral, 2° inmunización a los 21 días post implante tumoral; duración del ensayo 28 días.

Los resultados presentados hasta este punto de tiempo demuestran que el AdOE7 presenta efecto antitumoral terapéutico y es tan eficaz en retrasar la progresión tumoral como la vacuna de ADNE7 en un modelo terapéutico *in vivo*. Además, el efecto antitumoral tiene un impacto positivo en la sobrevida de los murinos, al presentar 100 % de sobrevida al término del estudio.

EFFECTO ANTITUMORAL PROFILÁCTICO DEL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO

Una vez demostrado el efecto antitumoral terapéutico, el siguiente paso fue demostrar si el AdOE7 confiere un efecto protector en contra del establecimiento tumoral. Para demostrarlo, se realizó un ensayo profiláctico en el cual se administraron 2 inmunizaciones con los AdO por vía intraperitoneal, previas al

implante tumoral utilizando los mismos grupos descritos en el ensayo terapéutico (n=5). La primera inmunización se realizó en el día 0 y la segunda una semana después de la primera (día 7); el día 14 se realizó la inoculación de las células tumorales TC-1 en el flanco derecho vía subcutánea. Posteriormente se midió el tamaño tumoral cada tercer día hasta el término del estudio en el día 28.

En los resultados del ensayo profiláctico, se detectó que los grupos control PBS y AdO sí desarrollaron tumores, alcanzando criterios de punto final a la cuarta semana post reto tumoral. Por el contrario, se observó un efecto protector en contra del establecimiento tumoral en aquellos ratones que fueron inmunizados con el AdOE7 al no desarrollar tumores en lo absoluto, tal como con la fusión génica administrada en forma de ADN (Figura 13).

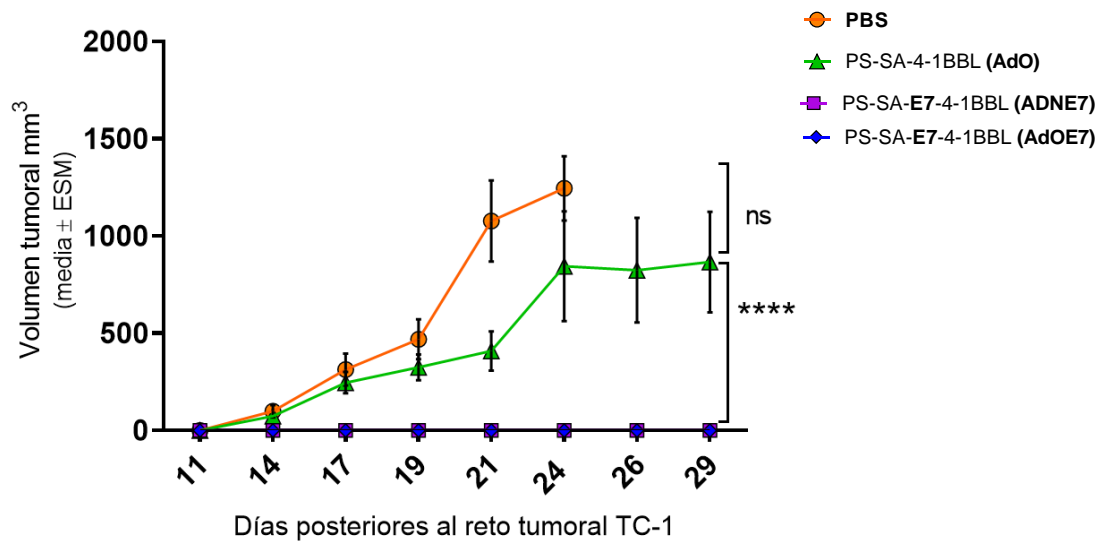


Figura 13. Efecto antitumoral profiláctico *in vivo*. Ratones de 6 a 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6 se inyectaron por vía intraperitoneal con 2.5×10^8 UI de adenovirus oncolítico en dos ocasiones (separadas por una semana), como control de referencia se administró la construcción de ADN en la piel abdominal afeitada con 1 μ g de ADN usando el sistema helios gene gun; se utilizó PBS 1X intraperitoneal como control negativo. El volumen del tumor se midió 10 días después del desafío tumoral con células TC-1 en el flanco derecho mediante inyección subcutánea. Los volúmenes tumorales están representados por la media \pm ESM (error estándar).

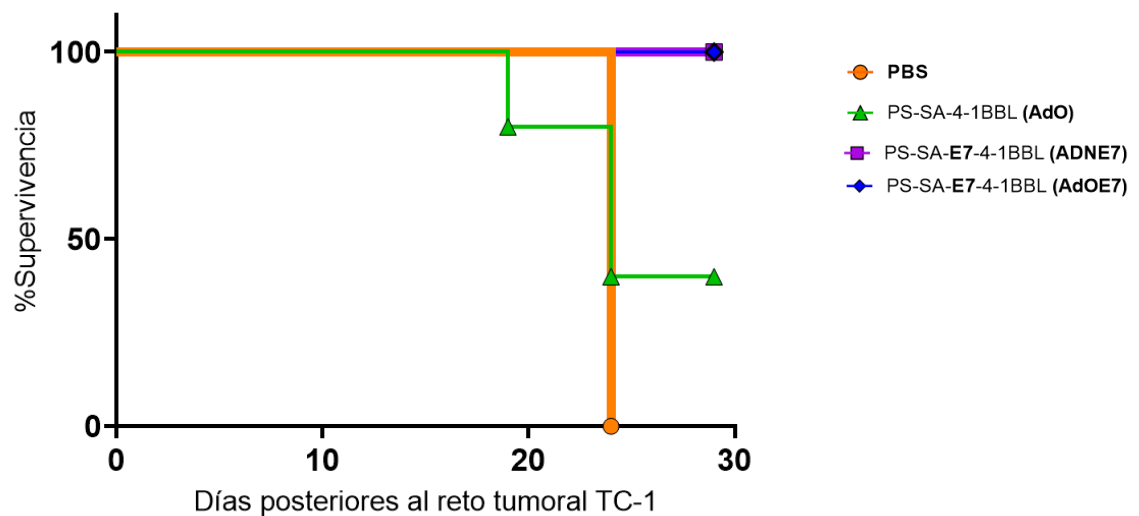


Figura 14. Sobrevida de los murinos del ensayo profiláctico. Sobrevida de los murinos posterior al reto con células tumorales TC-1 con previa administración de los diferentes tratamientos: PBS (sin adenovirus); AdO (adenovirus expresando la fusión génica sin E7); ADNE7 (recibió la construcción génica PS-SA-E7-4-1BBL mediante biobalística); AdOE7 (recibió el adenovirus oncolítico con la fusión génica con E7). Duración del ensayo 28 días.

Al observar una protección total mediada por el AdOE7, se decidió evaluar si el efecto protector permanecía a largo plazo. Dando seguimiento a los grupos de ratones que no presentaron desarrollo tumoral y añadiendo un nuevo grupo control negativo (PBS) n=3 de 20 semanas de edad, se realizó un segundo reto tumoral (día 47 desde el primer reto), en el flanco contralateral del ratón, registrando el desarrollo tumoral a través del tiempo.

En la figura 15 se muestran los resultados de este segundo reto, en el cual se aprecia un desarrollo tumoral progresivo en el grupo que solamente recibió PBS, alcanzando criterios de punto final en el tiempo estimado. Por otro lado, observamos que los dos grupos que recibieron la construcción génica AdOE7 y ADNE7 y que no desarrollaron tumores en un primer reto, tampoco lo hicieron tras un segundo reto tumoral. El seguimiento a 90 días tras la primera inoculación

de células tumorales muestra una protección duradera contra el desarrollo de tumores, así como una sobrevida del 100%, tres meses posteriores a la inmunización con los adenovirus recombinantes. Con estos resultados se evidencia que el efecto antitumoral profiláctico del AdOE7 perdura a través del tiempo.

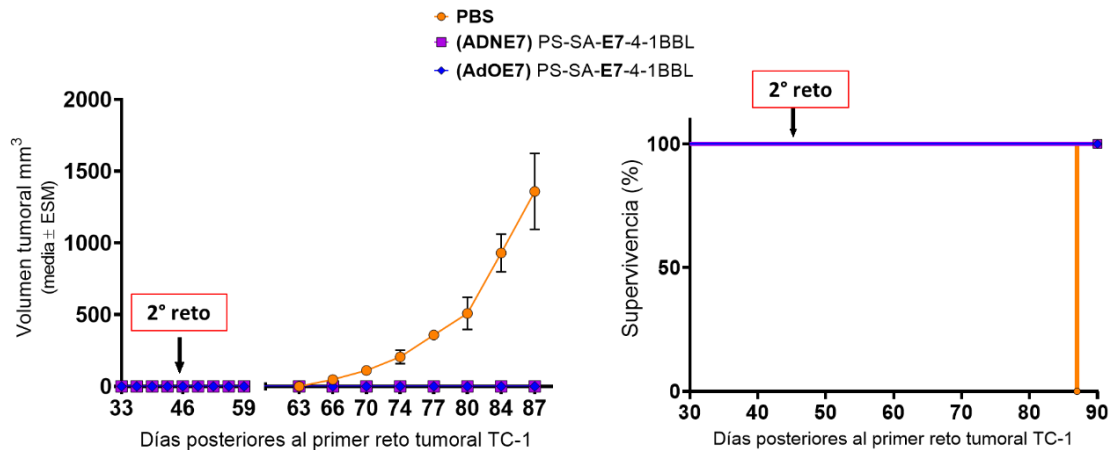


Figura 15. Ensayo profiláctico con un segundo reto tumoral. Ratones de la cepa C57BL/6 previamente inmunizados vía intraperitoneal con 2.5×10^8 UI de adenovirus oncolítico en dos ocasiones o con construcción de ADN 1 μg mediante biobalística ($n=5$), fueron desafiados por segunda ocasión con células TC-1 en el flanco izquierdo mediante inyección subcutánea; además se añadió un grupo control como evidencia de desarrollo tumoral ($n=3$) con PBS 1X intraperitoneal. El volumen del tumor se midió 10 días después del desafío tumoral. Izquierda: los volúmenes tumorales están representados por la media \pm ESM (error estándar). Se aplicaron los criterios de eutanasia cuando el volumen tumoral superó 1800 mm^3 . Derecha: Sobrevida de los grupos descritos previamente, tras un segundo reto tumoral a 90 días.

Dado que el efecto antitumoral profiláctico es absoluto, incluso a largo plazo, se decidió evaluar la dosis mínima necesaria para obtener el efecto protector. Para esto se administraron diluciones seriadas en factor de 10 del AdOE7 en un modelo profiláctico. Los resultados muestran que la dosis de 2.5×10^7 UI mantiene el efecto protector en el 100% de los murinos, mientras que con las dosis de 2.5×10^6 UI y 2.5×10^5 UI se presenta desarrollo tumoral en un 20% y 75 % respectivamente (Figura 16).

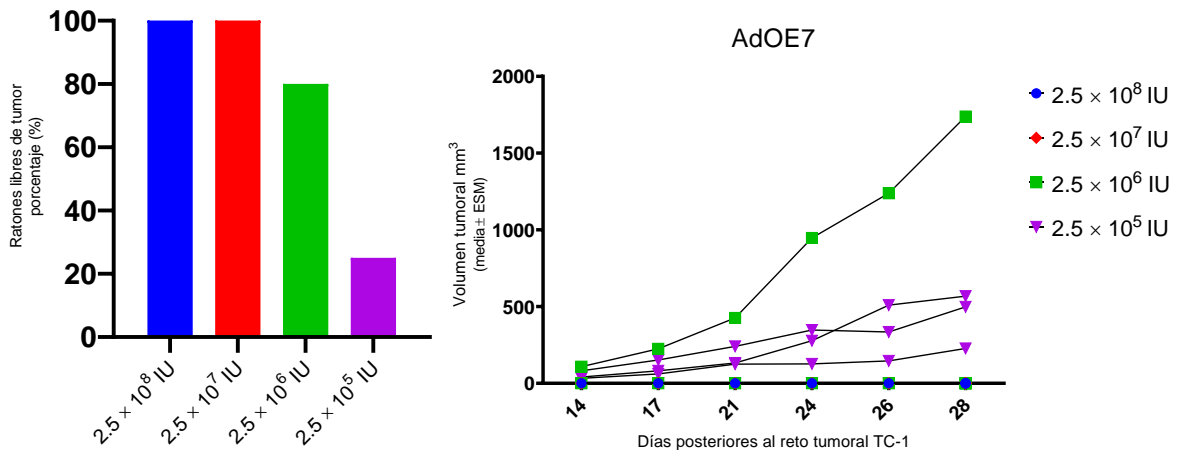


Figura 16. Efecto antitumoral profiláctico con diferentes diluciones del AdOE7. Izquierda: porcentaje de ratones libres de tumor tras 28 días del desafío tumoral y previamente inmunizados con el AdOE7 a dosis de 2.5×10^8 UI, 2.5×10^7 UI, 2.5×10^6 UI y 2.5×10^5 UI. Derecha: desafío tumoral de desarrollo tumoral individual y previamente inmunizados con el AdOE7 a dosis de 2.5×10^8 UI, 2.5×10^7 UI, 2.5×10^6 UI y 2.5×10^5 UI.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LA INMUNIZACIÓN CON EL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO

Una vez demostrado el efecto antitumoral profiláctico y terapéutico del adenovirus recombinante, el siguiente paso consistió en determinar si existe una relación entre el efecto antitumoral y la capacidad de inducir una respuesta inmune específica de tumor. Para ello se utilizaron hembras de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas ($n=5$) a las cuales se les administraron 2 inmunizaciones con los adenovirus recombinantes (AdOE7) o la fusión génica (ADNE7), así como los controles negativos sin antígeno E7 (AdO) y sin adenovirus (PBS).

Con el fin de asegurar el adecuado desarrollo de una respuesta inmune (Kaech et al., 2002) se colectó el bazo de los ratones hasta el día 26, esto es, 19 días posteriores a la última inmunización en donde se espera que en ese periodo de tiempo se haya generado una respuesta inmune completa. Se obtuvo la

suspensión celular de esplenocitos de cada sujeto que se utilizó para realizar los posteriores análisis *ex vivo* que incluyeron: análisis del perfil de citocinas y células antígeno-específicas productoras de IFN- γ .

PERFIL DE CITOCINAS SECRETADAS POR ESPLENOCITOS DE RATONES INMUNIZADOS CON LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES

La respuesta inmune antitumoral se caracteriza por la liberación de citocinas Th1 entre las que destacan IFN- γ , TNF- α , IL-2, produciendo una potente activación de células T, macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, una característica primordial de la respuesta de células T es su magnitud; la cual es representada como la frecuencia de células T específicas de antígeno productoras de IFN- γ (Raja et al., 2018; Seder et al., 2008). La elevación de citocinas de tipo Th2 (IL-4 e IL-10) y Th17 (IL-17A) está relacionada con la pobre respuesta antitumoral, así como un estado de agotamiento de células T que permite la progresión tumoral (Kim et al., 2021; Liu et al., 2021). Tomando lo anterior en consideración se evaluó el perfil de citocinas Th1/Th2/Th17.

Una vez obtenidos los esplenocitos provenientes de los murinos inmunizados, se obtuvo la fracción mononuclear y se cultivaron durante 5 días en condiciones estándar, posteriormente se incubaron en presencia o ausencia de antígeno E7 durante 72 horas, al finalizar se colectaron y agruparon los sobrenadantes de cinco sujetos por grupo y se cuantificaron las citocinas Th1/Th2/Th17 mediante un ensayo de citometría de flujo con perlas. Los resultados obtenidos fueron normalizados respecto a su control sin estimulación con el antígeno E7 (Figura 17).

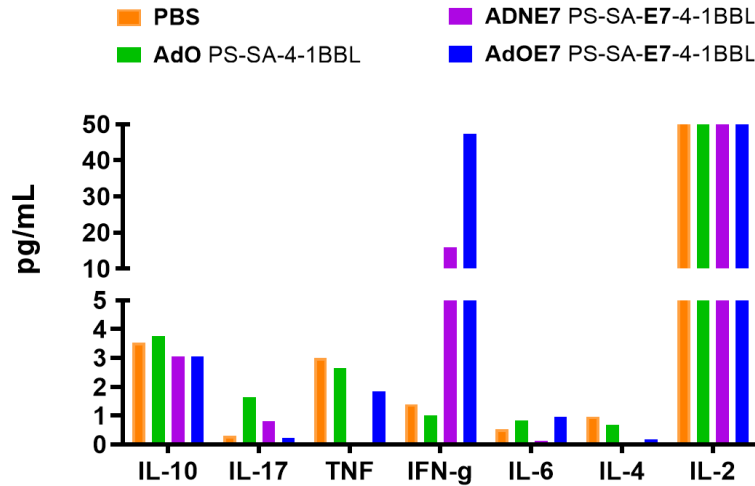


Figura 17. Perfil de citocinas Th1/Th2/Th17. Concentraciones de citocinas encontradas en sobrenadantes de células mononucleares de ratones previamente inmunizados (*in vivo*) y estimulados (*ex vivo*) con el antígeno E7 durante 72 h. Resultados normalizados respecto al control sin estimulación con el antígeno E7.

En el perfil de citocinas observamos concentraciones equivalentes de IL-2, ya que todos los grupos recibieron la citocina como un factor de proliferación y supervivencia celular. Es evidente la presencia de una respuesta Th1 en los ratones que fueron inmunizados con la fusión génica con AdOE7 y vacuna de ADNE7; la cual es caracterizada por la secreción de IFN- γ , en respuesta a la estimulación con el epítipo de respuesta T celular del antígeno E7 del VPH-16. Destaca una concentración de IFN- γ tres veces mayor en el grupo que recibió AdOE7, respecto al grupo que recibió ADNE7 (Figura 18).

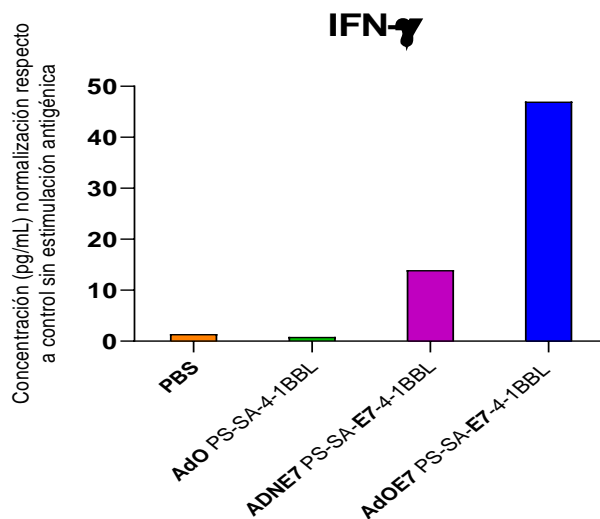


Figura 18. Niveles de IFN- γ en sobrenadantes de células mononucleares estimuladas con E7. Concentración de IFN- γ (pg/mL) en sobrenadantes de células mononucleares estimuladas con el epítipo de respuesta T celular CD8 del antígeno E7 del VPH-16. Los resultados se encuentran normalizados respecto a su control sin estimulación antigénica y corresponden a un pool de 5 sujetos independientes.

Interesantemente también se encontró un patrón de disminución de las citocinas Th2 o antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) así como Th17 o reguladora (IL-17a) en los grupos que recibieron la fusión génica completa AdOE7 y ADNE7, que puede apreciarse mejor al graficar las citocinas individualmente y normalizadas respecto a su control sin estimulación antigénica (Figura 19).

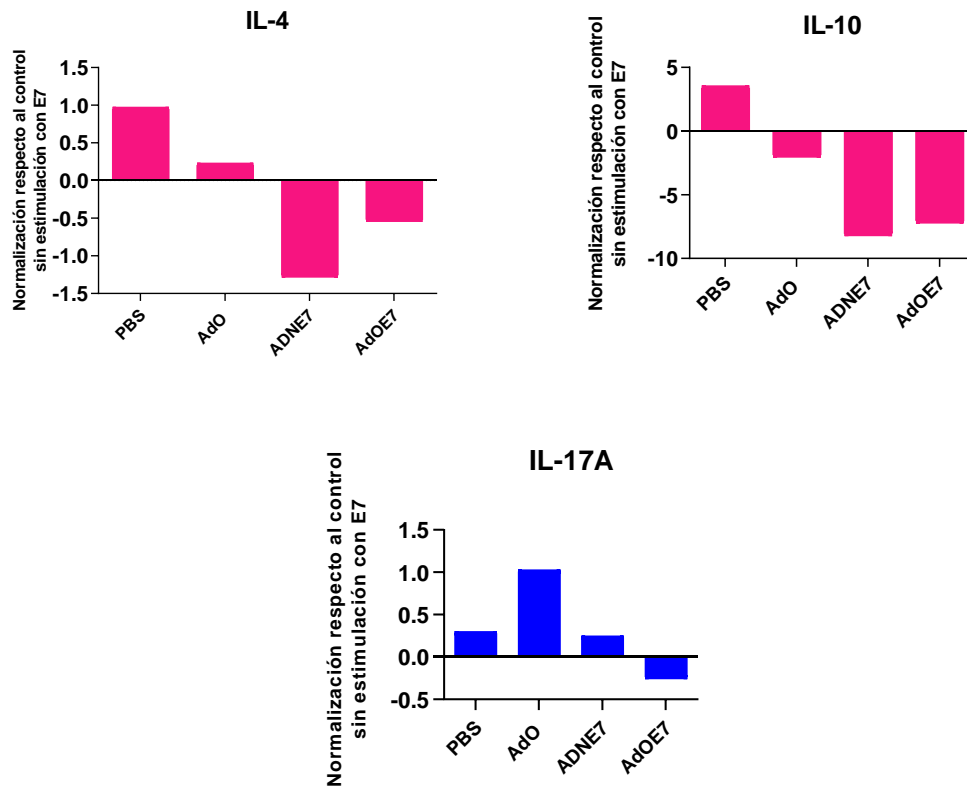


Figura 19. Citocinas Th2/Th17 secretadas por esplenocitos en respuesta a la estimulación con antígeno E7. Normalización de citocinas secretadas por esplenocitos de ratones previamente inmunizados y posteriormente estimulados con antígeno E7 respecto al control sin estimulación. Los sobrenadantes de 5 sujetos independientes fueron agrupados para el análisis por citometría de flujo.

Una vez detectado el perfil de citocinas Th1 liderado por la secreción IFN- γ en respuesta a la estimulación antigénica, el siguiente paso consistió en la detección de las células antígeno-específicas productoras de IFN- γ . Los esplenocitos obtenidos del modelo *in vivo* fueron cultivados y estimulados durante 5 días con el epítipo para respuesta celular T CD8 del antígeno E7 del VPH-16, en presencia de IL-2 en una placa de ELISPOT para IFN- γ . La señal positiva para

los esplenocitos productores de IFN- γ se observa como un patrón de puntos oscuros sobre la membrana de PVDF.

En la figura 20 (izquierda) se muestran fotografías representativas de los diferentes grupos experimentales, donde se observa nula o poca señal para todos los grupos experimentales en ausencia de estimulación antigénica. Por el contrario, al estimular con el antígeno E7 a los grupos con la fusión génica muestran señales positivas para esplenocitos productores de IFN- γ , siendo AdOE7 el de mayor cantidad de señales ($p < 0.0001$), comparado con el grupo ADNE7 ($p < 0.05$) al comparar con su respectivo control sin estimulación antigénica figura 20 (derecha).

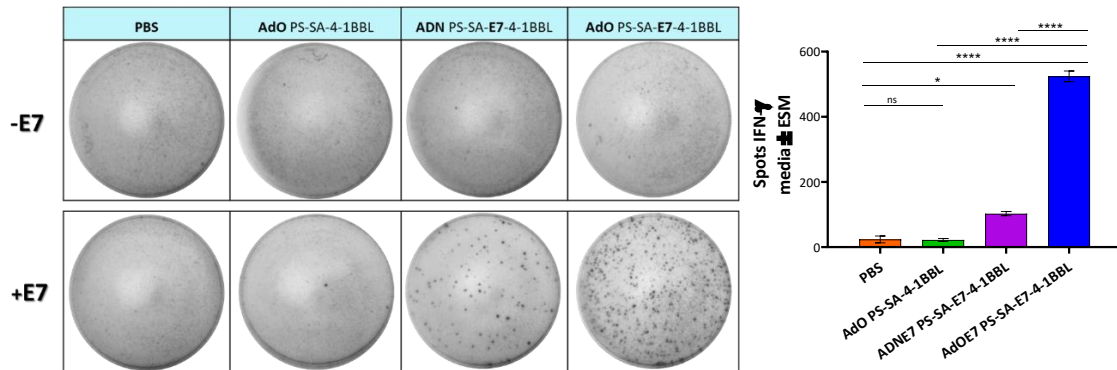


Figura 20. Detección de células productoras de IFN- γ en respuesta a la estimulación con el antígeno E7. Izquierda) Fotografías representativas de esplenocitos productores de IFN- γ los cuales, posterior a su aislamiento del modelo *in vivo* se cultivaron 1×10^6 células por pozo en presencia (+E7) y ausencia (-E7) antigénica, durante 5 días con el epítope del antígeno E7. En las fotografías se muestra la señal específica obtenida para IFN- γ en los distintos grupos de tratamiento: PBS (sin adenovirus); AdO (adenovirus expresando la fusión génica sin E7); ADNE7 (recibió la fusión génica con E7 mediante biobalística); AdOE7 (recibió el adenovirus oncolítico con la fusión génica con E7). Derecha) Cuantificación de las señales positivas para IFN- γ obtenidas al realizar la técnica de ELISPOT. El análisis estadístico fue por ANOVA de 1 vía con una prueba post-hoc de Tukey. ns, no significativo; * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN Y SEGURIDAD DEL USO DEL ADENOVIRUS ONCOLÍTICO

El tropismo de los adenovirus permite la infección de ciertos tipos celulares (epiteliales) sin que se lleve a cabo la generación de nuevas partículas virales (Alemany et al., 2000). La distribución y los tiempos de depuración de este vector se encuentran bien caracterizados, existiendo una transducción vascular hacia tejidos que no han sido inyectados (Alemany et al., 2000; Koski et al., 2015). Se realizó un ensayo de distribución para realizar la detección del virus en los principales órganos blanco y evaluar su eliminación a través del tiempo.

Se utilizaron hembras de la cepa C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad (n=3) por grupo, a las cuales se les realizó un implante tumoral con células TC-1 en el flanco derecho. Una vez corroborada la formación del tumor con un volumen $\geq 100 \text{ mm}^3$ (día 0) se administró intratumoralmente la dosis única con los adenovirus recombinantes. Posteriormente se realizó colecta de tejido pulmonar, hepático y pulmonar en 2 tiempos (día 2 y día 7) post-inmunización; así como en el día cero para el control sin inmunización.

La mitad de la muestra de los tejidos colectados se procesó por la técnica histológica convencional para la posterior tinción con hematoxilina y eosina para el análisis de la morfología y detección de la proteína estructural hexón del virus mediante inmunohistoquímica. La otra mitad de la muestra se almacenó por congelación rápida para su posterior procesamiento de extracción de ácidos nucleicos y detección de ADN viral mediante qPCR.

En el perfil de distribución del AdOE7 tras una administración intratumoral a dosis terapéuticas, a los 2 días post-inmunización se observa un incremento en la detección del virus en pulmón, hígado y tumor ($p < 0.0001$). Para el día 7 post-inmunización, únicamente el tejido tumoral presenta una concentración significativa de partículas virales ($p < 0.01$); lo que sugiere una depuración a lo largo del tiempo en los principales tejidos de distribución y la persistencia del genoma viral en el tumor (Figura 21).

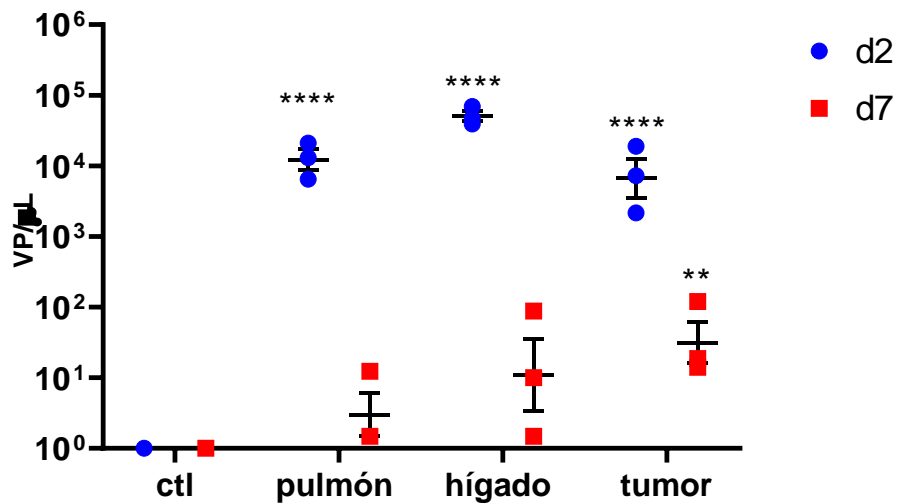


Figura 21. Perfil de distribución del AdOE7. Concentración de AdOE7 (VP/μL) en tejido pulmonar, hepático y tumoral a los dos y siete días post-inmunización, respecto al control sin infección. La concentración fue obtenida en base a una curva estándar realizada mediante qPCR de un AdOE7 de concentración conocida y cuantificada con el método de TCID₅₀/mL. El análisis estadístico fue por ANOVA de 2 vías con una prueba post-hoc de Sidak. **** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$

Para corroborar la presencia de las proteínas virales y su localización en los tejidos se realizaron las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica dirigidas contra la proteína estructural hexón del adenovirus. Se detectó señal positiva desde el día 2, y de mayor intensidad en el día 7 post-infección en tejido tumoral; evidenciando así la producción de las proteínas virales (Figura 22).

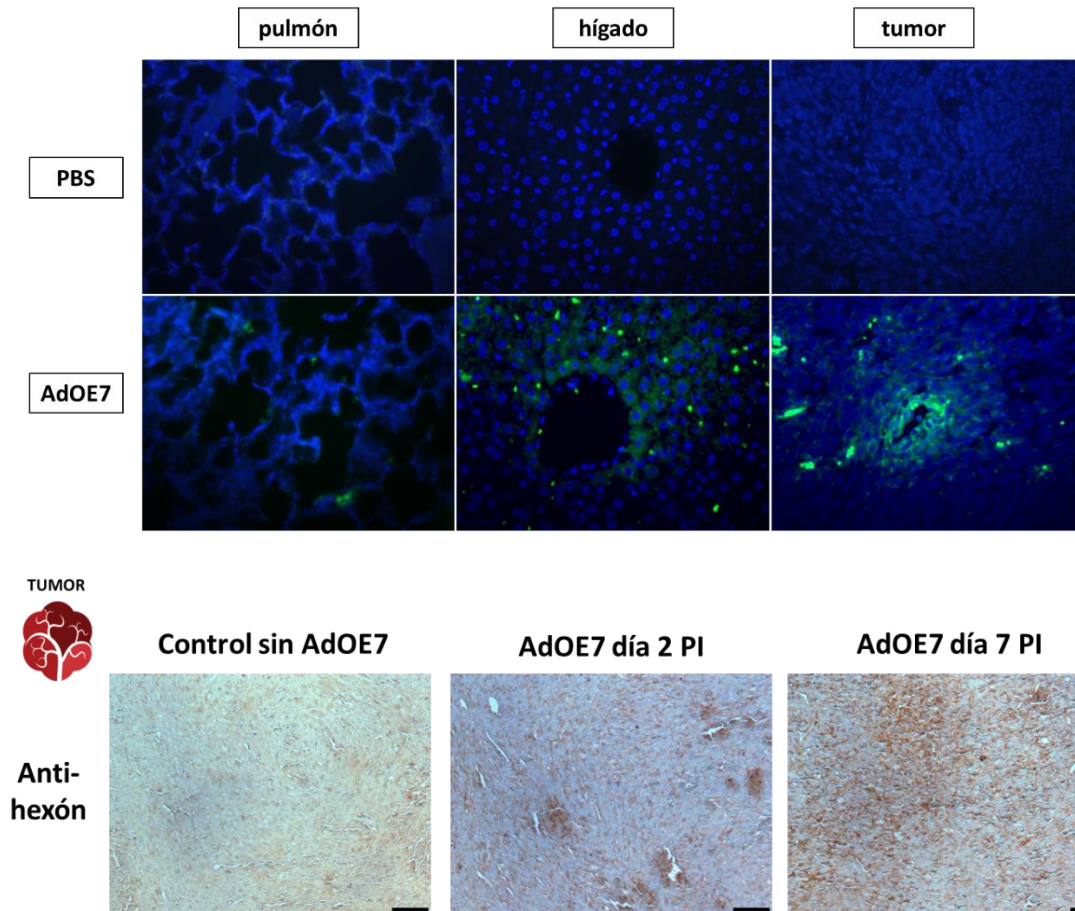


Figura 22. Detección de la proteína viral hexón en tejido pulmonar, hepático y tumoral. Fotomicrografías representativas de tejidos procesados por la técnica histológica convencional y posteriormente tratados con anticuerpos dirigidos contra la proteína estructural hexón del adenovirus, detectados por inmunofluorescencia IF (superior) a los 7 días postinfección; inmunohistoquímica IHQ (inferior) 2 y 7 días post infección. La señal positiva se observa en color verde (IF) y color marrón oscuro (IHQ). Tinción nuclear con DAPI (IF) y contratinción con el colorante verde de metilo al 2% (IHQ). Barra de escala 100 μ m.

Una vez demostrada la presencia de las partículas virales en tejidos distantes al sitio de inyección (tumor), el siguiente paso consistió en analizar los cambios morfológicos en los principales órganos de distribución. Mediante la tinción de H&E se observaron los diferentes tejidos a distintos tiempos: día 0 control basal sin infección, día 2 post-infección y día 7 post-infección.

Al día 0 es posible observar la morfología característica del tejido pulmonar caracterizada por los tabiques alveolares con sus porciones delgadas y gruesas, así como los espacios alveolares sin infiltrados; hacia el día 2 y más evidente al día 7 se observa un engrosamiento de los tabiques, así como un menor espacio alveolar, cambios que corresponden a la presencia del virus en el tejido. En cuanto al tejido hepático se observan a los hepatocitos dispuestos en cordones, así como los sinusoides hepáticos de características normales; la morfología descrita se preserva a los días 2 y 7 post-inmunización y no se presentan señales que indiquen el compromiso de alguna función vital (Figura 23).

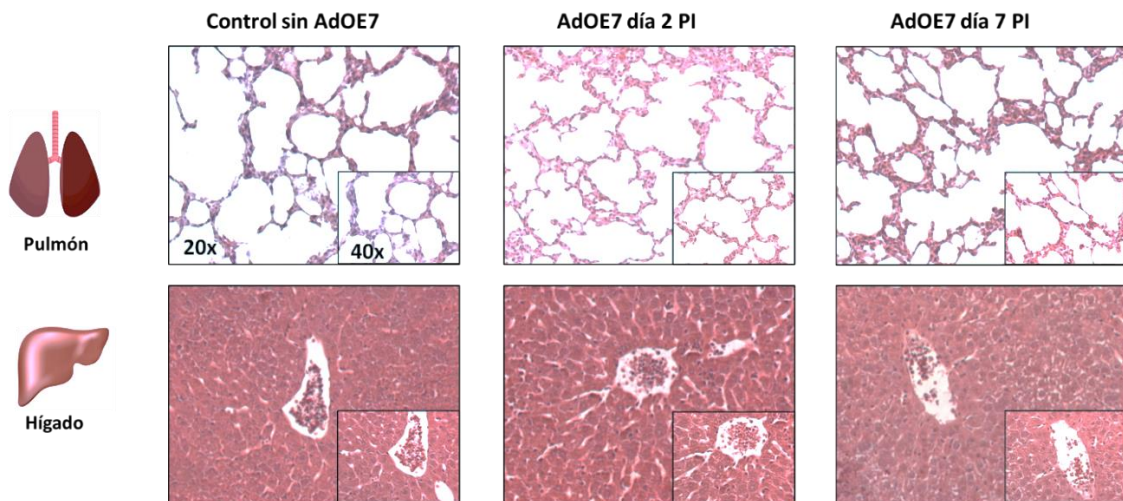


Figura 23. Cambios morfológicos en los principales órganos de distribución del AdOE7. Fotomicrografías de tejido pulmonar y hepático teñido con H&E a los 0, 2 y 7 días post-inmunización con el AdOE7. Cuadro grande: visualización con objetivo 20X; cuadro pequeño: visualización con objetivo 40X.

En tejido tumoral se observa al tiempo 0, las células tumorales sin una organización específica, con núcleos de diferentes tamaños y distribución irregular de la cromatina; muy similar al día 2 post inmunización. Sin embargo, para el día 7 se observa un abundante infiltrado inflamatorio entre las células tumorales.

Se realizó la técnica de IHQ con anticuerpos anti-CD8 para determinar si el infiltrado observado corresponde a células citotóxicas, encontrando positividad para dicho marcador en el tejido tumoral a los 7 días post-infección (Figura 24).

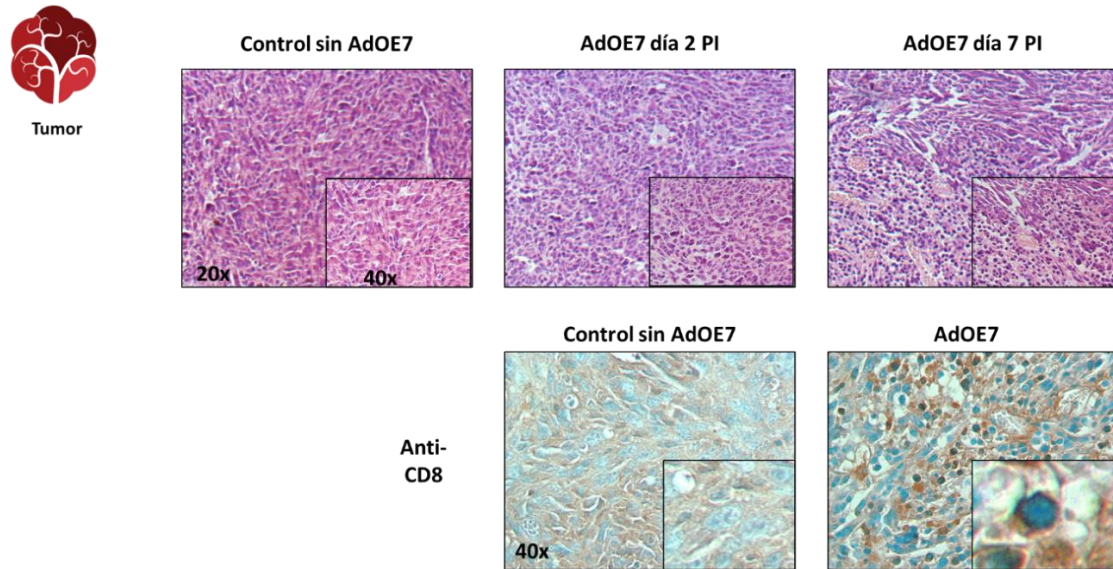


Figura 24. Efecto del AdOE7 sobre tejido tumoral. (Panel superior) fotomicrografías de tejido tumoral teñido con H&E a los días 0, 2 y 7 post-inmunización; cuadro grande: visualización con objetivo 20X; cuadro pequeño: visualización con objetivo 40X. (Panel inferior) Fotomicrografías de tejido tumoral procesado por la técnica de IHQ con anticuerpos dirigidos contra CD8 a los 7 días post-infección; cuadro pequeño: aumento de la visualización con el objetivo 40X. Señal positiva en marrón oscuro, contratinción nuclear con verde de metilo.

Varios estudios han mostrado que CXCL9 y CXCL10 (ligandos de CXCR3), particularmente CXCL10 producido por células tumorales o huésped, logran reclutar células T CD4 + infiltrantes de tumores CXCR3 +, células T CD8 + y células NK que están asociadas con la supresión tumoral (Karin, 2020).

Con la finalidad de identificar las diferentes poblaciones celulares reclutadas en el tejido tumoral se realizó la técnica de IHQ, utilizando anticuerpos anti-CD8 α (linfocitos T citotóxicos), CXCR1 (Receptor IL-8 en neutrófilos, monocitos y

linfocitos) y CXCR3 (linfocitos T efectores Th1 CD4+ y CD8+) en los grupos de PBS, AdO y AdOE7.

Para el grupo PBS no se detectó señal para alguno de los marcadores evaluados; para el adenovirus sin antígeno E7 se observa la presencia de infiltrado de predominio CXCR1, el cual se encuentra relacionado con la citotoxicidad inmediata dada por la respuesta inmune innata. Con el AdOE7 se observó señal para todos los marcadores evaluados, sin embargo; la señal predominante es de CXCR3, el cual es altamente expresado en linfocitos Th1 CD4+ y células T CD8 activadas, y se cree que es crítico para el reclutamiento de estas células a los sitios de inflamación (Figura 25).

Con estos resultados se evidencia la migración de células efectoras de respuesta inmune específica hacia el tejido tumoral, que aunado al perfil de citocinas encontrado sugiere una respuesta de tipo Th1 desencadenada por el uso del AdOE7.

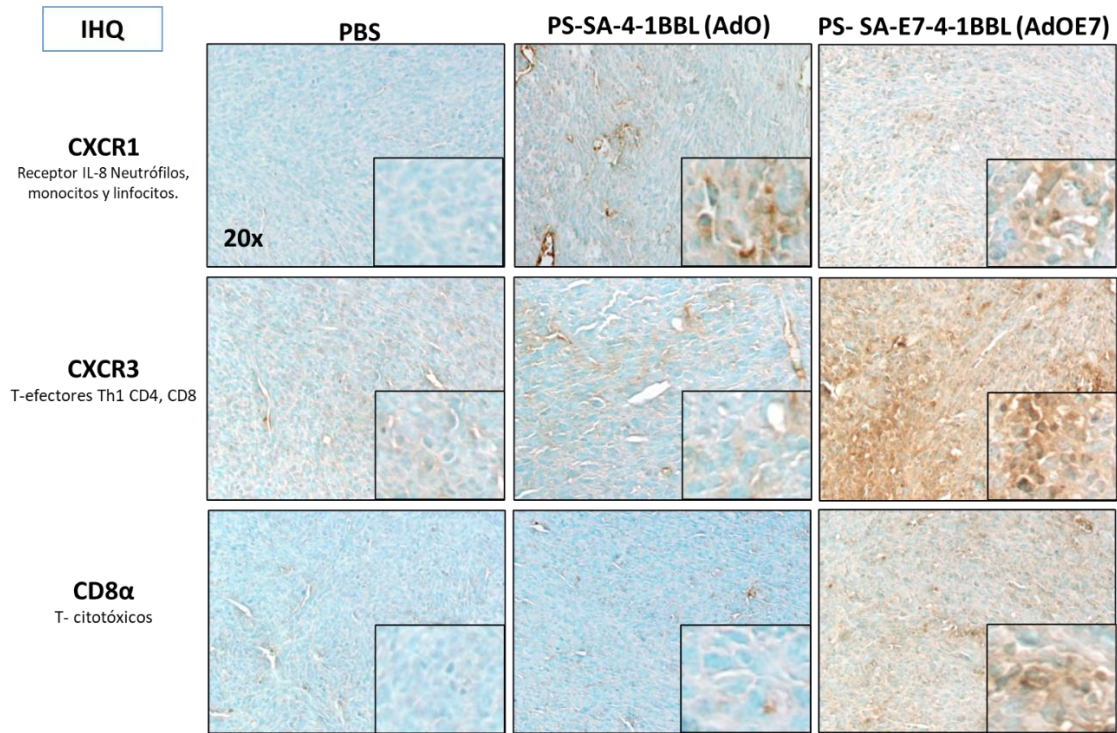


Figura 25. Poblaciones de linfocitos efectores CD8α, CXCR1 y CXCR3 en tejido tumoral. Fotomicrografías de tejido tumoral procesado por la técnica IHQ con anticuerpos dirigidos contra CD8α (linfocitos T citotóxicos, CXCR1 (Receptor IL-8 en neutrófilos, monocitos y linfocitos) y CXCR3 (linfocitos T efectores Th1 CD4+ y CD8+) 7 días posterior a la administración de los diferentes tratamientos: PBS, AdO y AdOE7. Contratinción verde de metilo. Cuadro grande: visualización objetivo 20X; cuadro pequeño: aumento de la visualización con el objetivo 40X.

DISCUSIÓN

Las vacunas profilácticas contra el cáncer de cuello uterino aprobadas por la FDA Gardasil, Gardasil 9 y Cervarix representan una estrategia primaria eficiente en los países que cuentan con acceso a ella. Sin embargo, existe una cobertura desproporcionada en todo el mundo, que correlaciona la enfermedad y la mortalidad por CaCu con el nivel socioeconómico (Bruni et al., 2016; Spayne & Hesketh, 2021; Sung et al., 2021). Debido a la alta incidencia de estadios avanzados de la enfermedad, existe la necesidad imperante de desarrollar enfoques terapéuticos eficientes, principalmente en los países de ingresos bajos y medios.

En los ensayos clínicos y preclínicos se han evaluado diversas vacunas terapéuticas contra el cáncer (Saxena et al., 2021); sin embargo, se ha encontrado un efecto modesto al ser administradas como monoterapia (DeMaria & Bilusic, 2019). Recientemente, en nuestro laboratorio se probó una vacuna de ADN que expresa PS-SA-E7-4-1BBL, exhibiendo efecto antitumoral terapéutico y profiláctico contra los tumores TC-1 que expresan el antígeno E7 del VPH-16 (Garza-Morales et al., 2019).

Las vacunas de ADN son de sencilla producción a bajo costo y pueden estimular las respuestas celulares y humorales, sin embargo, este efecto se ha limitado a modelos preclínicos (Lopes et al., 2019). Entre las principales limitantes de este sistema se incluyen una vía de administración local con una baja tasa de transfección que se limita a las células vecinas, pueden inducir tolerancia inmunológica, así como el riesgo de integración al genoma (Khan, 2013).

Los virus oncolíticos son ampliamente reportados por ser efectivos en la entrega de genes terapéuticos así como potenciar la respuesta T efectora en contra de tumores (Atherton et al., 2018; Cervera-Carrascon et al., 2020; Dai et al., 2017; Kuryk et al., 2018; Raja et al., 2018). La infección de las células tumorales por dichos vectores cambia la vía convencional de muerte celular de una no inflamatoria hacia una inflamatoria, con la liberación de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que consecuentemente activan al sistema inmune en una vía independiente de antígeno (Russell & Barber, 2018). Tras una administración local de virus oncolíticos se reporta una respuesta inmune antitumoral sistémica, relacionada con la inducción de una muerte inmunogénica de las células tumorales (Moesta et al., 2017; Wold & Toth, 2013).

Por lo tanto, decidimos utilizar la combinación de estos dos mecanismos: la expresión de un transgén que ha demostrado previamente un efecto antitumoral, y la lisis específica de las células tumorales por adenovirus oncolíticos, que se espera potencie el efecto antitumoral. Al administrar el AdOE7 en un modelo terapéutico, se obtuvo un potente efecto antitumoral al observar regresión de tumores previamente establecidos.

En el modelo profiláctico se observó una protección total frente al establecimiento de tumores TC-1 en ratones inmunizados con el AdOE7. Al utilizar una dosis de AdOE7 diez veces menor que la utilizada en el ensayo terapéutico, confiere una protección tumoral del 100%. Existen diferencias importantes durante el diseño de las vacunas antitumorales, ya que las vacunas terapéuticas en comparación con la profilácticas enfrentan resistencia intrínseca y extrínseca, tales como la

regulación a la baja de la expresión de antígenos y las células inmunosupresoras en el microambiente tumoral (Saxena et al., 2021).

La inmunización con el AdOE7 confirió un efecto protector total contra el desarrollo de tumores TC-1, incluso después de un segundo reto tumoral, sugiriendo el establecimiento de una memoria inmunológica. Este hallazgo contrasta con las terapias descritas previamente en las que se requieren dosis múltiples (Dai et al., 2017; Kuryk et al., 2018). Cuando se eliminó el antígeno del constructo se perdió el efecto antitumoral, evidenciando una respuesta inmune antígeno-dependiente; con lo que esta terapia podría ser utilizada para atacar otros antígenos expresados por diferentes tumores.

A diferencia de las vacunas convencionales, que se basan en la inoculación de un agente causal o una porción de éste para generar una respuesta de anticuerpos; las vacunas de nueva generación codifican secuencias para antígenos específicos que proporcionan las proteínas correspondientes a la célula para establecer una respuesta inmune adecuada con la inducción de memoria de células T efectoras (Domínguez-Andrés et al., 2020; Porchia et al., 2017).

La inmunización con el AdOE7 indujo una respuesta específica de antígeno, como lo demuestra la generación de células productoras de IFN- γ . Este efecto también se observó, aunque en menor medida, al inmunizar con ADNE7. Aunque en nuestro modelo el efecto antitumoral fue similar con el AdOE7 y ADNE7, hubo mayor estimulación del sistema inmune por parte del AdOE7, lo que podría suponer una ventaja al utilizarlo en modelos que presenten un ambiente inmunosupresor. La estimulación del sistema inmune con 4-1BBL está

relacionada con la regulación a la baja de la respuesta inmunosupresora, dada por un incremento en el ratio de células CD8+ T efectoras/CD4+ Foxp3+ (Srivastava et al., 2014). Aunque el análisis del microambiente tumoral excede el alcance de este estudio, como primera aproximación, se investigó el perfil de citocinas secretadas en respuesta a la inmunización con AdOE7, revelando una clara respuesta efectora Th1 encabezada por la secreción de IFN- γ por esplenocitos estimulados *in vitro* con el antígeno E7. Además, una disminución en las citoquinas antiinflamatorias Th2 y Th17 proporciona un ambiente ideal para el establecimiento de la respuesta antitumoral. Sin embargo, estos hallazgos aún deben complementarse con un análisis completo del microambiente tumoral.

Además de ser eficaz, la terapia con adenovirus oncolíticos es segura y bien tolerada en ensayos preclínicos y clínicos (Dai et al., 2017; Eriksson et al., 2017; Garcia-Carbonero et al., 2017; Rodríguez-García et al., 2015). La distribución y los niveles virales en diversos tejidos después de la administración *in situ* son necesarios para evaluar la seguridad del AdOE7. Los hallazgos mostraron que los virus se distribuyeron en los tejidos epiteliales, como se ha reportado previamente al utilizar estos vectores (Koski et al., 2015); se observó una eliminación del virus por los tejidos no tumorales para el día 7, tal como se ha reportado en estudios preclínicos (Rodríguez-García et al., 2015).

La detección del virus prevalece predominantemente en el tejido tumoral a través del tiempo, lo que indica la replicación selectiva del tumor. La infección se presenta en tejido no tumoral; sin embargo, carece de efectos nocivos porque en el tejido no tumoral se presenta una morfología propia de una infección viral sin alteraciones que pongan en peligro alguna función vital.

CONCLUSIONES

El AdOE7 confiere un efecto antitumoral profiláctico y terapéutico en un modelo murino de cáncer.

La administración del AdOE7 induce la formación de células efectoras específicas de tumor.

El AdOE7 migra a través de la circulación a otros tejidos epiteliales como hígado y pulmón sin inducir cambios morfológicos significativos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alderson, M. R., Smith, C. A., Tough, T. W., Davis-Smith, T., Armitage, R. J., Falk, B., Roux, E., Baker, E., Sutherland, G. R., & Din, W. S. (1994). Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *European Journal of Immunology*, *24*(9), 2219-2227.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830240943>
- Aleman, R., Suzuki, K., & Curiel, D. T. (2000). Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *The Journal of General Virology*, *81*(Pt 11), 2605-2609. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-11-2605>
- Atherton, M. J., Stephenson, K. B., Nikota, J. K., Hu, Q. N., Nguyen, A., Wan, Y., & Lichty, B. D. (2018). Preclinical development of peptide vaccination combined with oncolytic MG1-E6E7 for HPV-associated cancer. *Vaccine*, *36*(16), 2181-2192. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.070>
- Barsoumian, H. B., Batra, L., Shrestha, P., Bowen, W. S., Zhao, H., Egilmez, N. K., Gomez-Gutierrez, J. G., Yolcu, E. S., & Shirwan, H. (2019). A Novel Form of 4-1BBL Prevents Cancer Development via Nonspecific Activation of CD4+ T and Natural Killer Cells. *Cancer Research*, *79*(4), 783-794.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2401>
- Bitra, A., Doukov, T., Croft, M., & Zajonc, D. M. (2018). Crystal structures of the human 4-1BB receptor bound to its ligand 4-1BBL reveal covalent receptor dimerization as a potential signaling amplifier. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(26), 9958-9969.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003176>

- Bitra, A., Doukov, T., Destito, G., Croft, M., & Zajonc, D. M. (2019). Crystal structure of the m4-1BB/4-1BBL complex reveals an unusual dimeric ligand that undergoes structural changes upon 4-1BB receptor binding. *The Journal of Biological Chemistry*, *294*(6), 1831-1845.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006297>
- Bitra, A., Doukov, T., Wang, J., Picarda, G., Benedict, C. A., Croft, M., & Zajonc, D. M. (2018). Crystal structure of murine 4-1BB and its interaction with 4-1BBL support a role for galectin-9 in 4-1BB signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(4), 1317-1329.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.814905>
- Bitra, A., & Zajonc, D. M. (2019). Evolution of differential 4-1BB signaling in Human and Murine immune system. *The FASEB Journal*, *33*(S1), 461.3-461.3. https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.461.3
- Bruni, L., Diaz, M., Barrionuevo-Rosas, L., Herrero, R., Bray, F., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., & Castellsagué, X. (2016). Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: A pooled analysis. *The Lancet Global Health*, *4*(7), e453-e463.
[https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30099-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30099-7)
- Cáncer. (s. f.). Recuperado 6 de enero de 2020, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Cervera-Carrascon, V., Quixabeira, D. C. A., Havunen, R., Santos, J. M., Kutvonen, E., Clubb, J. H. A., Siurala, M., Heiniö, C., Zafar, S., Koivula, T., Lumen, D., Vaha, M., Garcia-Horsman, A., Airaksinen, A. J., Sorsa, S., Anttila, M., Hukkanen, V., Kanerva, A., & Hemminki, A. (2020).

- Comparison of Clinically Relevant Oncolytic Virus Platforms for Enhancing T Cell Therapy of Solid Tumors. *Molecular Therapy Oncolytics*, 17, 47-60. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.03.003>
- Cheuk, A. T. C., Mufti, G. J., & Guinn, B. (2004). Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Therapy*, 11(3), 215-226. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700670>
- Dai, B., Roife, D., Kang, Y., Gumin, J., Rios Perez, M. V., Li, X., Pratt, M., Brekken, R. A., Fueyo-Margareto, J., Lang, F. F., & Fleming, J. B. (2017). Preclinical Evaluation of Sequential Combination of Oncolytic Adenovirus Delta-24-RGD and Phosphatidylserine-targeting Antibody in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Molecular cancer therapeutics*, 16(4), 662-670. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0526>
- Dejardin, E. (2006). The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development. *Biochemical Pharmacology*, 72(9), 1161-1179. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.08.007>
- DeMaria, P. J., & Bilusic, M. (2019). Cancer Vaccines. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 33(2), 199-214. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.12.001>
- Domínguez-Andrés, J., van Crevel, R., Divangahi, M., & Netea, M. G. (2020). Designing the Next Generation of Vaccines: Relevance for Future Pandemics. *MBio*, 11(6), e02616-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02616-20>

- Duan, Y., Bai, H., Li, X., Wang, D., Wang, Y., Cao, M., Zhang, N., Chen, H., & Wang, Y. (2021). Oncolytic Adenovirus H101 Synergizes with Radiation in Cervical Cancer Cells. *Current Cancer Drug Targets*, 21(7), 619-630. <https://doi.org/10.2174/1568009621666210308103541>
- Eriksson, E., Milenova, I., Wenthe, J., Ståhle, M., Leja-Jarblad, J., Ullenhag, G., Dimberg, A., Moreno, R., Alemany, R., & Loskog, A. (2017). Shaping the Tumor Stroma and Sparking Immune Activation by CD40 and 4-1BB Signaling Induced by an Armed Oncolytic Virus. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(19), 5846-5857. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0285>
- Escors, D. (2014). Tumour immunogenicity, antigen presentation and immunological barriers in cancer immunotherapy. *New journal of science*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/734515>
- Garcia-Carbonero, R., Salazar, R., Duran, I., Osman-Garcia, I., Paz-Ares, L., Bozada, J. M., Boni, V., Blanc, C., Seymour, L., Beadle, J., Alvis, S., Champion, B., Calvo, E., & Fisher, K. (2017). Phase 1 study of intravenous administration of the chimeric adenovirus enadenotucirev in patients undergoing primary tumor resection. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 5(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0277-7>
- Garza-Morales, R., Perez-Trujillo, J. J., Martinez-Jaramillo, E., Saucedo-Cardenas, O., Loera-Arias, M. J., Garcia-Garcia, A., Rodriguez-Rocha, H., Yolcu, E., Shirwan, H., Gomez-Gutierrez, J. G., & Montes-de-Oca-Luna, R. (2019). A DNA Vaccine Encoding SA-4-1BBL Fused to HPV-16

E7 Antigen Has Prophylactic and Therapeutic Efficacy in a Cervical Cancer Mouse Model. *Cancers*, 11(1).

<https://doi.org/10.3390/cancers11010096>

Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., & Banerjee, A. (2006). Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models.

Oncogene, 25(51), 6781-6799. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209944>

Goradel, N. H., Mohajel, N., Malekshahi, Z. V., Jahangiri, S., Najafi, M.,

Farhood, B., Mortezaee, K., Negahdari, B., & Arashkia, A. (2019).

Oncolytic adenovirus: A tool for cancer therapy in combination with other therapeutic approaches. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8636-

8646. <https://doi.org/10.1002/jcp.27850>

Hollingsworth, R. E., & Jansen, K. (2019). Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *Npj Vaccines*, 4(1), Article 1.

<https://doi.org/10.1038/s41541-019-0103-y>

Howells, A., Marelli, G., Lemoine, N. R., & Wang, Y. (2017). Oncolytic Viruses- Interaction of Virus and Tumor Cells in the Battle to Eliminate Cancer.

Frontiers in Oncology, 7, 195. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00195>

Huang, H., Liu, Y., Liao, W., Cao, Y., Liu, Q., Guo, Y., Lu, Y., & Xie, Z. (2019).

Oncolytic adenovirus programmed by synthetic gene circuit for cancer immunotherapy. *Nature Communications*, 10(1), 4801.

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12794-2>

Jensen, M. M., Jørgensen, J. T., Binderup, T., & Kjaer, A. (2008). Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more

accurate and reproducible than determined by ¹⁸F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Medical Imaging*, 8, 16.

<https://doi.org/10.1186/1471-2342-8-16>

Kaech, S. M., Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: Implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 2(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nri778>

Kamensek, U., Cemazar, M., Lamprecht Tratar, U., Ursic, K., & Sersa, G. (2018). Antitumor in situ vaccination effect of TNF α and IL-12 plasmid DNA electrotransfer in a murine melanoma model. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67(5), 785-795. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2133-0>

Karin, N. (2020). CXCR3 Ligands in Cancer and Autoimmunity, Chemoattraction of Effector T Cells, and Beyond. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00976>

Keskin, D. B., Anandappa, A. J., Sun, J., Tirosh, I., Mathewson, N. D., Li, S., Oliveira, G., Giobbie-Hurder, A., Felt, K., Gjini, E., Shukla, S. A., Hu, Z., Li, L., Le, P. M., Allesøe, R. L., Richman, A. R., Kowalczyk, M. S., Abdelrahman, S., Geduldig, J. E., ... Reardon, D. A. (2019). Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature*, 565(7738), 234-239. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0792-9>

Khan, K. H. (2013). DNA vaccines: Roles against diseases. *Germs*, 3(1), 26-35. <https://doi.org/10.11599/germs.2013.1034>

- Kim, B.-S., Kuen, D.-S., Koh, C.-H., Kim, H.-D., Chang, S. H., Kim, S., Jeon, Y. K., Park, Y.-J., Choi, G., Kim, J., Kang, K. W., Kim, H. Y., Kang, S.-J., Hwang, S., Shin, E.-C., Kang, C.-Y., Dong, C., & Chung, Y. (2021). Type 17 immunity promotes the exhaustion of CD8+ T cells in cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(6), e002603. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002603>
- Koski, A., Bramante, S., Kipar, A., Oksanen, M., Juhila, J., Vassilev, L., Joensuu, T., Kanerva, A., & Hemminki, A. (2015). Biodistribution Analysis of Oncolytic Adenoviruses in Patient Autopsy Samples Reveals Vascular Transduction of Noninjected Tumors and Tissues. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 23(10), 1641-1652. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.125>
- Kuryk, L., Møller, A. W., Garofalo, M., Cerullo, V., Pesonen, S., Alemany, R., & Jaderberg, M. (2018). Antitumor-specific T-cell responses induced by oncolytic adenovirus ONCOS-102 (AdV5/3-D24-GM-CSF) in peritoneal mesothelioma mouse model. *Journal of Medical Virology*, 90(10), 1669-1673. <https://doi.org/10.1002/jmv.25229>
- Kwon, B. S., & Weissman, S. M. (1989). CDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(6), 1963-1967.
- Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zheng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., ... He, T.-C. (2017). Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and

- Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine. *Genes & Diseases*, 4(2), 43-63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>
- Li, S.-Y., & Liu, Y. (2013). Immunotherapy of melanoma with the immune costimulatory monoclonal antibodies targeting CD137. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 5(Suppl 1), 47-53. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S46199>
- Liu, C., Liu, R., Wang, B., Lian, J., Yao, Y., Sun, H., Zhang, C., Fang, L., Guan, X., Shi, J., Han, S., Zhan, F., Luo, S., Yao, Y., Zheng, T., & Zhang, Y. (2021). Blocking IL-17A enhances tumor response to anti-PD-1 immunotherapy in microsatellite stable colorectal cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(1), e001895. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001895>
- Lopes, A., Vandermeulen, G., & Pr at, V. (2019). Cancer DNA vaccines: Current preclinical and clinical developments and future perspectives. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1154-7>
- Mantwill, K., Klein, F. G., Wang, D., Hindupur, S. V., Ehrenfeld, M., Holm, P. S., & Nawroth, R. (2021). Concepts in Oncolytic Adenovirus Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10522. <https://doi.org/10.3390/ijms221910522>
- Martínez-P erez, A. G. (2019). *Desarrollo de un adenovirus oncolítico que exprese el sistema adyuvante 4-1BBL fusionado al antígeno E7*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Martinez-Perez, A. G., Perez-Trujillo, J. J., Garza-Morales, R., Loera-Arias, M. J., Saucedo-Cardenas, O., Garcia-Garcia, A., Rodriguez-Rocha, H., & Montes-de-Oca-Luna, R. (2021). 4-1BBL as a Mediator of Cross-Talk between Innate, Adaptive, and Regulatory Immunity against Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms22126210>

McPherson, A. J., Snell, L. M., Mak, T. W., & Watts, T. H. (2012). Opposing Roles for TRAF1 in the Alternative versus Classical NF- κ B Pathway in T Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(27), 23010-23019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.350538>

Moesta, A. K., Cooke, K., Piasecki, J., Mitchell, P., Rottman, J. B., Fitzgerald, K., Zhan, J., Yang, B., Le, T., Belmontes, B., Ikotun, O. F., Merriam, K., Glaus, C., Ganley, K., Cordover, D. H., Boden, A. M., Ponce, R., Beers, C., & Beltran, P. J. (2017). Local Delivery of OncoVEXmGM-CSF Generates Systemic Antitumor Immune Responses Enhanced by Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein Blockade. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(20), 6190-6202. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0681>

Mousavi, T., Sattari Saravi, S., Valadan, R., Haghshenas, M. R., Rafiei, A., Jafarpour, H., & Shamshirian, A. (2020). Different types of adjuvants in prophylactic and therapeutic human papillomavirus vaccines in laboratory animals: A systematic review. *Archives of Virology*, 165(2), 263-284. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04479-4>

- Orange, M., Reuter, U., & Hobohm, U. (2016). Coley's Lessons Remembered: Augmenting Mistletoe Therapy. *Integrative Cancer Therapies*, 15(4), 502-511. <https://doi.org/10.1177/1534735416649916>
- Philip, M., & Schietinger, A. (2022). CD8+ T cell differentiation and dysfunction in cancer. *Nature Reviews. Immunology*, 22(4), 209-223. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00574-3>
- Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: A synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609-e616. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)
- Porchia, B. F. M. M., Moreno, A. C. R., Ramos, R. N., Diniz, M. O., de Andrade, L. H. T. M., Rosa, D. S., Barbuto, J. A. M., Boscardin, S. B., & Ferreira, L. C. S. (2017). Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Targets a Specific Dendritic Cell Subset and Improves the Performance of Vaccines to Human Papillomavirus-Associated Tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(9), 1922-1933. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0071>
- Rabu, C., Quéméner, A., Jacques, Y., Echasserieau, K., Vusio, P., & Lang, F. (2005). Production of recombinant human trimeric CD137L (4-1BBL). Cross-linking is essential to its T cell co-stimulation activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41472-41481. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506881200>
- Raja, J., Ludwig, J. M., Gettinger, S. N., Schalper, K. A., & Kim, H. S. (2018). Oncolytic virus immunotherapy: Future prospects for oncology. *Journal*

for *Immunotherapy of Cancer*, 6(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0458-z>

Rodríguez-García, A., Giménez-Alejandre, M., Rojas, J. J., Moreno, R., Bazan-Peregrino, M., Cascalló, M., & Alemany, R. (2015). Safety and Efficacy of VCN-01, an Oncolytic Adenovirus Combining Fiber HSG-Binding Domain Replacement with RGD and Hyaluronidase Expression. *Clinical Cancer Research*, 21(6), 1406-1418. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2213>

Russell, S. J., & Barber, G. N. (2018). Oncolytic Viruses as Antigen-Agnostic Cancer Vaccines. *Cancer Cell*, 33(4), 599-605. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.011>

Sadraeian, M., Khoshnood Mansoorkhani, M. J., Mohkam, M., Rasoul-Amini, S., Hesaraki, M., & Ghasemi, Y. (2013). Prevention and Inhibition of TC-1 Cell Growth in Tumor Bearing Mice by HPV16 E7 Protein in Fusion with Shiga Toxin B-Subunit from shigella dysenteriae. *Cell Journal*, 15(2), 176-181.

Saxena, M., van der Burg, S. H., Melief, C. J. M., & Bhardwaj, N. (2021). Therapeutic cancer vaccines. *Nature Reviews. Cancer*, 21(6), 360-378. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00346-0>

Schabowsky, R.-H., Elpek, K. G., Madireddi, S., Sharma, R. K., Yolcu, E. S., Bandura-Morgan, L., Miller, R., MacLeod, K. J., Mittler, R. S., & Shirwan, H. (2009). A Novel Form of 4-1BBL Has Better Immunomodulatory Activity than an Agonistic Anti-4-1BB Ab without Ab Associated Severe

Toxicity. *Vaccine*, 28(2), 512-522.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.127>

Schabowsky, R.-H., Sharma, R. K., Madireddi, S., Srivastava, A., Yolcu, E. S., &

Shirwan, H. (2009). ProtEx™ technology for the generation of novel therapeutic cancer vaccines. *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.01.010>

Seder, R. A., Darrah, P. A., & Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: Implications for vaccine design. *Nature Reviews. Immunology*, 8(4), 247-258. <https://doi.org/10.1038/nri2274>

Seki, T., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Miyauchi, M., Akiyama, N., Yamaguchi, N., Gohda, J., Akiyama, T., & Inoue, J. (2015). Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level during dendritic cell maturation in Relb-Venus knock-in mice. *The Journal of Biochemistry*, 158(6), 485-495. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv064>

Sharma, R. K., Schabowsky, R. H., Srivastava, A. K., Elpek, K. G., Madireddi, S., Zhao, H., Zhong, Z., Miller, R. W., MacLeod, K. J., Yolcu, E. S., & Shirwan, H. (2010). 4-1BB Ligand as an Effective Multifunctional Immunomodulator and Antigen Delivery Vehicle for the Development of Therapeutic Cancer Vaccines. *Cancer Research*, 70(10), 3945-3954. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4480>

Sharma, R. K., Srivastava, A. K., Yolcu, E. S., MacLeod, K. J., Schabowsky, R.-H., Madireddi, S., & Shirwan, H. (2010). SA-4-1BBL as the immunomodulatory component of a HPV-16 E7 protein based vaccine shows robust therapeutic efficacy in a mouse cervical cancer model.

Vaccine, 28(36), 5794-5802.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.073>

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7-33.

<https://doi.org/10.3322/caac.21654>

Spayne, J., & Hesketh, T. (2021). Estimate of global human papillomavirus vaccination coverage: Analysis of country-level indicators. *BMJ Open*, 11(9), e052016. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-052016>

Srivastava, A. K., Dinc, G., Sharma, R. K., Yolcu, E. S., Zhao, H., & Shirwan, H. (2014). SA-4-1BBL and monophosphoryl lipid A constitute an efficacious combination adjuvant for cancer vaccines. *Cancer Research*, 74(22), 6441-6451. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1768-A>

Srivastava, A. K., Sharma, R. K., Yolcu, E. S., Ulker, V., MacLeod, K., Dinc, G., & Shirwan, H. (2012). Prime-boost vaccination with SA-4-1BBL costimulatory molecule and survivin eradicates lung carcinoma in CD8+ T and NK cell dependent manner. *PloS One*, 7(11), e48463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048463>

Sun, S.-C. (2012). The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunological Reviews*, 246(1), 125-140. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x>

Sun, S.-C. (2017). The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 17(9), 545-558. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates

of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.

CA: A Cancer Journal for Clinicians, 71(3), 209-249.

<https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Velcheti, V., & Schalper, K. (2016). Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer. *American Society of Clinical Oncology*

Educational Book, 36, 298-308. https://doi.org/10.1200/EDBK_156572

Wold, W. S. M., & Toth, K. (2013). Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Current Gene Therapy*, 13(6), 421-433.

Zapata, J. M., Perez-Chacon, G., Carr-Baena, P., Martinez-Forero, I.,

Azpilikueta, A., Otano, I., & Melero, I. (2018). CD137 (4-1BB)

Signalosome: Complexity Is a Matter of TRAFs. *Frontiers in Immunology*,

9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02618>

Zhao, Y., Liu, Z., Li, L., Wu, J., Zhang, H., Zhang, H., Lei, T., & Xu, B. (2021).

Oncolytic Adenovirus: Prospects for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in*

Microbiology, 12, 707290. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.707290>

Zhou, Z., Kim, S., Hurtado, J., Lee, Z. H., Kim, K. K., Pollok, K. E., & Kwon, B. S.

(1995). Characterization of human homologue of 4-1BB and its ligand.

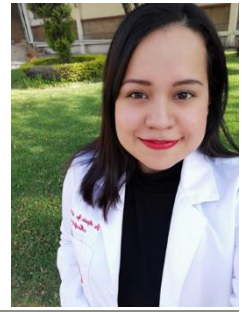
Immunology Letters, 45(1-2), 67-73.

APÉNDICE

Curriculum Vitae

Artículos publicados

M.C. ALEJANDRA GUADALUPE MARTÍNEZ PÉREZ



DATOS GENERALES

Domicilio: Paseo Corona #202 Col. Paseo Amberes Sector Alemán, Guadalupe, Nuevo León
C.P.67130

Fecha de Nacimiento: 26 de julio de 1990 Edad: 32 años Estado Civil: Casada

Nacionalidad: Mexicana

RFC: MAPA900726PFA CURP: MAPA900726MNLRRLO3 Cédula profesional: 8979127

Correo electrónico: alejandra.martinezpr@uanl.edu.mx Móvil: 8115039519

DATOS ACADÉMICOS

EDUCACION DE PREGRADO

- Licenciatura en Médico Cirujano y Partero
 - Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina (2007-2013)
 - Promedio General: 83.93
 - Internado de Pregrado: Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Promedio 83.53
- Servicio Social
 - Secretaría de Salud de Nuevo León, Jurisdicción Sanitaria N° 2, Microred 3, C.S.R Ciénega de Flores
 - Inicio: 1-Agosto-2013 Término: 31-Julio-2014
- Examen Profesional
 - 16 de Diciembre del 2013
 - Tipo de titulación: Escrita
 - Resultado aprobado: Satisfactorio

EDUCACION DE POSGRADO

- Maestría en Ciencias con Orientación en Morfología
 - Inicio 7- Agosto- 2017 Término 2- Agosto- 2019
- Doctorado en Ciencias con Orientación en Morfología
 - Inicio 01- Septiembre 2019 Término 31- Julio- 2023

IDIOMAS

- Español: Lengua materna
- Inglés: Intermedio

PUBLICACIONES

- **Martínez-Pérez AG**, Perez-Trujillo JJ, Garza-Morales R, Ramirez-Avila NE, Loera-Arias MJ, Gomez-Gutierrez JG, Saucedo-Cardenas O, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H, Montes-de-Oca-Luna R. An Oncolytic Adenovirus Encoding SA-4-1BBL Adjuvant Fused to HPV-16 E7 Antigen Produces a Specific Antitumor Effect in a Cancer Mouse Model. *Vaccines (Basel)*. 2021 Feb 12;9(2):149. doi: 10.3390/vaccines9020149.
- **Martínez-Pérez AG**, Perez-Trujillo JJ, Garza-Morales R, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cardenas O, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H, Montes-de-Oca-Luna R. 4-1BBL as a Mediator of Cross-Talk between Innate, Adaptive, and Regulatory Immunity against Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 9;22(12):6210. doi: 10.3390/ijms22126210.
- Loera-Arias MJ, **Martínez-Pérez AG**, Barrera-Hernández A, Ibarra-Obregón ER, González-Saldívar G, Martínez-Ortega JI, Rosas-Taraco A, Villanueva-Olivo A, Esparza-González SC, Villatoro-Hernandez J, Saucedo-Cárdenas O, Montes-de-Oca-Luna R. Targeting and retention of HPV16 E7 to the endoplasmic reticulum enhances immune tumour protection. *J Cell Mol Med*. 2010 Apr;14(4):890-4. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00934.x.

CONGRESOS

- Presentación oral del trabajo titulado “Antitumor-specific immunity induced by an oncolytic adenovirus encoding E7 HPV-16 antigen and SA-4-1BBL in a cancer mouse model” en el **XXV Congreso Nacional de inmunología**, llevado a cabo en la Ciudad de Querétaro, del 4 al 8 de Junio del 2023.
- Presentación en modalidad póster del trabajo titulado “Antitumor-specific immunity induced by an oncolytic adenovirus encoding E7 HPV-16 antigen and SA-4-1BBL in a cancer mouse model” en el **XXV Congreso Nacional de inmunología**, llevado a cabo en la Ciudad de Querétaro, del 4 al 8 de Junio del 2023.
- Presentación en modalidad póster del trabajo titulado “OAd-mediated SA-4-1BBL fused to HPV-16 E7 elicits specific antitumor efficacy in syngeneic mouse lung cancer model” en **Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2023**, 2023 Apr 14-19; Orlando, FL. Philadelphia.
- Presentación Oral de la publicación “An Oncolytic Adenovirus Encoding SA-4-1BBL Adjuvant Fused to HPV-16 E7 Antigen Produces a Specific Antitumor Effect in a Cancer Mouse Model” en el **31° Congreso Nacional de Investigación e Innovación en Medicina** “Shared research scientific knowledge”, llevado a cabo del 6 al 9 de octubre del 2021 en Monterrey, N.L. México.
- Participación en modalidad póster del trabajo titulado “Desarrollo de un adenovirus oncolítico que exprese el adyuvante 4-1BBL fusionado al antígeno E7” en el **XXIV Congreso Nacional de inmunología**, llevado a cabo de manera virtual en la Ciudad de México, del 23 al 28 de Abril del 2021.
- Presentación en modalidad póster del trabajo “Desarrollo de un adenovirus oncolítico que exprese el adyuvante 4-1BBL fusionado al antígeno E7” en la modalidad de cartel en el **30° Congreso Nacional de Investigación e Innovación en Medicina** “Knowledge and Innovation Transforming Medicine”, llevado a cabo del 2 al 5 de octubre del 2019 en Monterrey, N.L. México.

SIMPOSIOS Y CONFERENCIAS



- Participación en el “**Simposio de área básica**” Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, 13 de junio de 2019. Obteniendo el 2° lugar con el tema “Desarrollo de un adenovirus oncolítico que exprese el adyuvante 4-1BBL fusionado al antígeno E7”.

RECONOCIMIENTOS

- Primer lugar en la competencia **DESAFIO INVEST**, Facultad de Medicina UANL, septiembre 2009, Monterrey N.L. México.
- Nombramiento al **Estudiante de Posgrado Distinguido** en el Doctorado en Ciencias con Orientación en Morfología en el año 2021, por la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL.
- **Premio de Investigación UANL 2022**, por el trabajo de investigación en el área de ciencias de la salud denominado: “Desarrollo de un sistema adenoviral con actividad lítica específica contra células tumorales”, septiembre del 2022.

Article

An Oncolytic Adenovirus Encoding SA-4-1BBL Adjuvant Fused to HPV-16 E7 Antigen Produces a Specific Antitumor Effect in a Cancer Mouse Model

Alejandra G. Martinez-Perez ^{1,†}, Jose J. Perez-Trujillo ^{1,†}, Rodolfo Garza-Morales ², Norma E. Ramirez-Avila ¹, Maria J. Loera-Arias ¹, Jorge G. Gomez-Gutierrez ², Odila Saucedo-Cardenas ^{1,3}, Aracely Garcia-Garcia ¹, Humberto Rodriguez-Rocha ¹ and Roberto Montes-de-Oca-Luna ^{1,*}



Citation: Martinez-Perez, A.G.; Perez-Trujillo, J.J.; Garza-Morales, R.; Ramirez-Avila, N.E.; Loera-Arias, M.J.; Gomez-Gutierrez, J.G.; Saucedo-Cardenas, O.; Garcia-Garcia, A.; Rodriguez-Rocha, H.; Montes-de-Oca-Luna, R.

An Oncolytic Adenovirus Encoding SA-4-1BBL Adjuvant Fused to HPV-16 E7 Antigen Produces a Specific Antitumor Effect in a Cancer Mouse Model. *Vaccines* **2021**, *9*, 149. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020149>

Academic Editor: Takashi Imai
Received: 31 December 2020
Accepted: 4 February 2021
Published: 12 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Department of Histology, School of Medicine, Autonomous University of Nuevo León, Monterrey, NL 64460, Mexico; alejandra.martinezpr@uanl.edu.mx (A.G.M.-P.); jperez.me0052@uanl.edu.mx (J.J.P.-T.); nramireza@avantsante.com (N.E.R.-A.); mdjesus.loeraars@uanl.edu.mx (M.J.L.-A.); odila.saucedocr@uanl.edu.mx (O.S.-C.); aracely.garciagr@uanl.edu.mx (A.G.-G.); humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx (H.R.-R.)
 - ² Department of Surgery, School of Medicine, University of Louisville, Louisville, KY 40202, USA; rodolfo.garzamorales@utrgv.edu (R.G.-M.); jgguti01@louisville.edu (J.G.G.-G.)
 - ³ Department of Molecular Genetics, Northeast Biomedical Research Center, Mexican Institute of Social Security (IMSS), Monterrey, NL 64000, Mexico
- * Correspondence: rrrmontes@gmail.com; Tel.: +52-1-81-8329-4195
† Contributed equally.

Abstract: Human papillomaviruses (HPVs) are responsible for about 25% of cancer cases worldwide. HPV-16 E7 antigen is a tumor-associated antigen (TAA) commonly expressed in HPV-induced tumors; however, it has low immunogenicity. The interaction of 4-1BBL with its receptor induces pleiotropic effects on innate, adaptive, and regulatory immunity and, if fused to TAAs in DNA vaccines, can improve the antitumor response; however, there is low transfection and antitumor efficiency. Oncolytic virotherapy is promising for antitumor gene therapy as it can be selectively replicated in tumor cells, inducing cell lysis, and furthermore, tumor cell debris can be taken in by immune cells to potentiate antitumor responses. In this study, we expressed the immunomodulatory molecule SA-4-1BBL fused to E7 on an oncolytic adenovirus (OAd) system. In vitro infection of TC-1 tumor cells and NIH-3T3 non-tumor cells with SA/E7/4-1BBL OAd demonstrated that only tumor cells are selectively destroyed. Moreover, protein expression is targeted to the endoplasmic reticulum in both cell lines when a signal peptide (SP) is added. Finally, in an HPV-induced cancer murine model, the therapeutic oncolytic activity of OAd can be detected, and this can be improved when fused to E7 and SP.

Keywords: 4-1BBL; cancer vaccines; oncolytic virus; HPV-16 antigen

1. Introduction

Cancer ranks among the leading causes of mortality with approximately 8 million deaths worldwide registered in 2015 [1], predominately in low and medium socioeconomic countries. Around 25% of all cancer cases are caused by oncogenic viral infections such as human papillomavirus (HPV) 16 and 18 serotypes [2].

Current treatments are surgery, radiation therapy, and chemotherapy, resulting in efficient tumor clearance. Unfortunately, these strategies lead to adverse effects that affect the patient's quality of life, a high tumor recurrence rate, and development of resistance to chemotherapy. Thus, new therapeutic approaches have been explored. Gene therapy has been used as a vaccine technology that employs naked DNA or vectors (viral and non-viral) to express modified recombinant antigens and immunostimulant molecules to elicit a specific immune response capable of eliminating tumor cells [3].



Review

4-1BBL as a Mediator of Cross-Talk between Innate, Adaptive, and Regulatory Immunity against Cancer

Alejandra G. Martinez-Perez ¹, Jose J. Perez-Trujillo ¹, Rodolfo Garza-Morales ², Maria J. Loera-Arias ¹, Odila Saucedo-Cardenas ^{1,3}, Aracely Garcia-Garcia ¹, Humberto Rodriguez-Rocha ¹ and Roberto Montes-de-Oca-Luna ^{1,*}

- ¹ Department of Histology, School of Medicine, Autonomous University of Nuevo Leon, Monterrey 64460, Mexico; alejandra.martinezpr@uanl.edu.mx (A.G.M.-P.); jlperez.me0052@uanl.edu.mx (J.J.P.-T.); mdjesus.loeraars@uanl.edu.mx (M.J.L.-A.); odila.saucedocr@uanl.edu.mx (O.S.-C.); aracely.garciagr@uanl.edu.mx (A.G.-G.); humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx (H.R.-R.)
 - ² Internal Medicine Residency Program, University of Texas Rio Grande Valley, Edinburg, TX 78539, USA; rodolfo.garzamoraes@utrgv.edu
 - ³ Department of Molecular Genetics, Northeast Biomedical Research Center, Mexican Institute of Social Security (IMSS), Monterrey 64000, Mexico
- * Correspondence: roberto.montesdeocaln@uanl.edu.mx; Tel.: +52-1-81-8329-4195



Citation: Martinez-Perez, A.G.; Perez-Trujillo, J.J.; Garza-Morales, R.; Loera-Arias, M.J.; Saucedo-Cardenas, O.; Garcia-Garcia, A.; Rodriguez-Rocha, H.; Montes-de-Oca-Luna, R. 4-1BBL as a Mediator of Cross-Talk between Innate, Adaptive, and Regulatory Immunity against Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6210. <https://doi.org/10.3390/ijms22126210>

Academic Editor: Alvaro Teixeira

Received: 22 April 2021
Accepted: 28 May 2021
Published: 9 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The ability of tumor cells to evade the immune system is one of the main challenges we confront in the fight against cancer. Multiple strategies have been developed to counteract this situation, including the use of immunostimulant molecules that play a key role in the anti-tumor immune response. Such a response needs to be tumor-specific to cause as little damage as possible to healthy cells and also to track and eliminate disseminated tumor cells. Therefore, the combination of immunostimulant molecules and tumor-associated antigens has been implemented as an anti-tumor therapy strategy to eliminate the main obstacles confronted in conventional therapies. The immunostimulant 4-1BBL belongs to the tumor necrosis factor (TNF) family and it has been widely reported as the most effective member for activating lymphocytes. Hence, we will review the molecular, pre-clinical, and clinical applications in conjunction with tumor-associated antigens in antitumor immunotherapy, as well as the main molecular pathways involved in this association.

Keywords: 4-1BBL; cancer immunology; immunotherapy; cancer therapy; cancer vaccination

1. Introduction

Cancer incidence cases continue to rise, registering over 18 million recent cases and over 9 million deaths in 2018, distributed worldwide [1]. Current therapeutic options include surgery, radiation therapy, and chemotherapy, which, despite being efficient for tumor clearance, have significant side effects that affect the patient's quality of life. They have also registered a high recurrence rate and the formation of tumor-resistant clones [2,3]. Hence, new therapeutic approaches are essential to counteract such inconveniences and to ensure full tumor cell eradication.

Gene therapy involves using genetically modified RNA and/or DNA coding homologous or heterologous proteins to replenish a specific protein deficiency or trigger a specific cell response. This is the most used strategy to express antigens and immunostimulatory molecules to induce protective memory immunity against various pathogens and tumor cells [4].

4-1BBL is an immunostimulant molecule that interacts with the 4-1BB high-affinity receptor during the antigen presentation, providing costimulatory signals to both CD4+ and CD8+ T cells through the activation of NF- κ B, c-Jun, and p38 downstream pathways, triggering pleiotropic effects on the immune system [5]. Thus, it has been proposed to use it as a complex with epitopes or antigens of pathogens that induces an increase in the specific immune response of antigen [6].