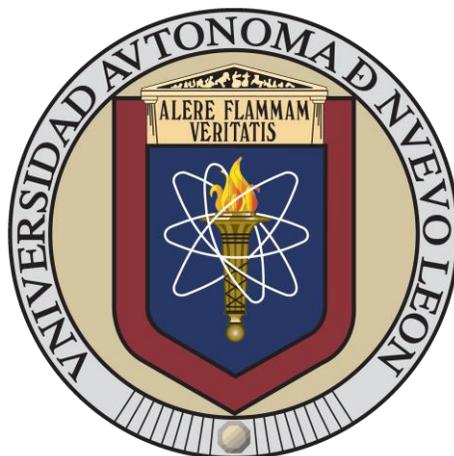


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE VECTORES QUE DIRIGEN LA
EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO TUMORAL E7 FLANQUEADO POR
SEÑALES DE ENVÍO Y RETENCIÓN EN RETÍCULO ENDOPLÁSMICO
EN COMBINACIÓN CON CD40L**

POR

M. C. P. JESÚS IVÁN MARTÍNEZ ORTEGA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

Septiembre, 2025

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE VECTORES QUE DIRIGEN LA
EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO TUMORAL E7 FLANQUEADO POR
SEÑALES DE ENVÍO Y RETENCIÓN EN RETÍCULO
ENDOPLÁSMICO EN COMBINACIÓN CON CD40L**

Comité de Tesis



Dra. C. María de Jesús Loera Arias

Director



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna

Co-Director



Dr. C. José Juan Pérez Trujillo

Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Sub-Director de Estudios de Posgrado

LUGAR DE TRABAJO Y DIRECCIÓN DE TESIS

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la supervisión de la Dra. María de Jesús Loera y el Dr. Roberto Montes de Oca Luna. Este proyecto fue financiado por el ProACTI 191-MCS (2023-2025).



Dra. María de Jesús Loera Arias
Director de tesis



Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Co-director de tesis

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. María de Jesús Loera Arias, por su guía, confianza y apoyo a lo largo de este camino académico.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por creer en mí. Gracias por mantenerme las puertas abiertas después de tanto tiempo, por su flexibilidad y empatía al comprender mis inquietudes y mis diferencias formativas, y, aun con todo lo que ello implica, integrarme.

Al Dr. David Hernán Martínez, por compartir sus habilidades y destrezas, y al Dr. José Juan Pérez, por todo su trabajo y compromiso. A todos ellos, y en general a los anteriores, por el extenuante esfuerzo y las incontables horas invertidas en este proyecto, mi más profundo reconocimiento.

A mi familia, que ha sido el pilar más importante de mi vida: a mi papá, desde donde esté; a mi mamá, porque todo lo que soy y lo que he logrado ha sido gracias a su amor, ejemplo y fortaleza en muchos aspectos que no caben en estas páginas; a mi hermano David, por inspirarme con su ejemplo; y a mi abuelita Gilda, quien con sus 95 años ha sido como una fuente centenaria de amor que ilumina muchas vidas.

A mi gran amigo Elvis, a quien considero parte de mi familia, por su apoyo académico e intelectual, y por las largas charlas, viajes y risas que hicieron más ligero este trayecto.

A mis compañeros de laboratorio, que con su amistad y apoyo hicieron de este camino una experiencia compartida: a Mariana, por la fortuna de ser mi vecina de cubículos, por sus agradables pláticas, por compartir su amplia experiencia técnica y académica, y por su amistad; a Leonel Gómez, por tantas horas invertidas en mi proyecto; a Gloria y Ulises, por Farah, Daniela, Cristina, Edgar Piña y Juan Carlos. También agradezco a mis compañeros

de maestría de otros departamentos, quienes enriquecieron esta etapa con su presencia y colaboración.

Finalmente, a todas las personas que, de una u otra manera, me han apoyado, inspirado o creído en mí, aunque no estén mencionadas explícitamente. Cada palabra de aliento, cada gesto y cada presencia han sido fundamentales; todos están en mis pensamientos y en la esencia de este trabajo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado a lo largo de mis estudios de maestría.

DEDICATORIA

"If I have seen further, it is by standing on the shoulders of giants."

— Isaac Newton, carta a Robert Hooke (5 de febrero de 1675)

Con estas palabras, Newton reconocía que sus descubrimientos no fueron logros aislados, sino el resultado de apoyarse en el trabajo y la visión de quienes lo precedieron. Hoy hago mías esas palabras para dedicar este trabajo al Departamento de Histología, espacio donde encontré no solo conocimiento, sino también un entorno de colaboración que hizo posible mi formación.

A la Dra. María de Jesús Loera Arias y al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, quienes con su guía, apoyo y confianza han representado para mí esos “gigantes” en cuyos hombros he podido ver más lejos y avanzar en este camino académico.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	VI
INDICE.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
1.1 CÁNCER CERVICOUTERINO	2
1.2 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH).....	3
1.2.1 <i>Proteína E7 del VPH-16</i>	6
1.2.2 <i>Respuesta inmune antiviral</i>	10
1.2.3 <i>Evasión molecular mediada por oncoproteínas del VPH</i>	11
1.2.4 <i>Nuevos mecanismos de evasión: inhibición del eje CD40–CD40L</i>	14
1.3 TERAPIA GÉNICA EN VPH	20
1.4 VÍA CD40–CD40L: GENERALIDADES Y ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN VPH	24
1.5 VACUNAS DE ADN EN VPH	29
1.5.1 <i>Estado actual de las vacunas de ADN terapéuticas contra el VPH</i>	29
1.5.2 <i>Fundamento inmunológico y optimización del diseño</i>	33
1.6 PROTEOSTASIS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO	34
1.6.1 <i>Control de calidad en retículo endoplásmico</i>	34
1.6.2 <i>Respuesta a proteínas mal plegadas</i>	35
1.6.3 <i>Degradación asociada a retículo endoplásmico</i>	36
1.6.4 <i>Papel de las disulfuro isomerasas en el control de calidad del RE</i>	37
1.6.5 <i>Retrotranslocación de proteínas del RE al proteasoma</i>	38
1.6.6 <i>Presentación de antígenos por MHC-I</i>	38

1.6.7	<i>Implicaciones para direccionar antígenos al RE</i>	40
1.6.8	<i>Estrategias de direccionamiento al RE para potenciar respuestas CD8⁺</i>	42
3.	JUSTIFICACIÓN	53
4.	HIPÓTESIS	54
5.	OBJETIVOS	55
6.	METODOLOGÍA	60
6.1.	DISEÑO DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN	60
6.2.	PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	60
6.3.	DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	61
6.4.	TRANSFECCIÓN DE LOS VECTORES EN CULTIVO CELULAR	61
6.5.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	62
6.6.	ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR POR INMUNOFLUORESCENCIA	63
6.7.	ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA POR ELISA	64
6.8.	ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA MEDIANTE ANÁLISIS MORFOLÓGICO	65
6.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	65
7.	RESULTADOS	66
7.1.	DISEÑO DE LOS VECTORES QUE EXPRESAN E7 Y CD40L	66
7.2.	LA CARACTERIZACIÓN DE LOS VECTORES REVELA LOS FRAGMENTOS DEL TAMAÑO ESPERADO	67
7.3.	EXPRESIÓN DE E7 Y CD40L E INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA DE ESTRÉS EN ER	69
7.4.	LA PROTEÍNA CD40L SE LOCALIZA EN LA MEMBRANA CELULAR	70
8.	DISCUSIÓN	78
9.	CONCLUSIÓN	84
10.	REFERENCIAS	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del cáncer cervicouterino.....	3
Figura 2. Estructura esquemática del Virus del Papiloma Humano (VPH).....	4
Figura 3. Esquema de la infección por VPH y representación del genoma de VPH-16.....	5
Figura 4. Comparación de estructuras de la oncoproteína E7 de VPH-45 y VPH-16. .	8
Figura 5. Interacción del motivo LXCXE de E7 con pRb.....	9
Figura 6. Posibles respuestas en células endoteliales mediante la activación de CD40.....	15
Figura 7. Micropartículas derivadas de queratinocitos que expresan E7 y su efecto en CD40	17
Figura 8. Estrategias de vacunación frente al VPH y métodos de entrega.....	23
Figura 9. Modelo de CD40L predicho por AlphaFold.....	24
Figura 10. Presentación de antígenos por MHCI.....	33
Figura 11. Esquema del direccionamiento de E7 al RE mediante péptido señal y KDEL.....	49
Figura 12. Estrategias de direccionamiento antigénico al RE en inmunoterapia contra VPH.....	52
Figura 13. Diseño y caracterización de los vectores de expresión.....	66
Figura 14. Caracterización de los vectores E7 y E7-CD40L.....	67
Figura 15. Caracterización de vectores CD40L y vector vacío.....	68
Figura 16. Expresión de E7, CD40L y GRP-78 como marcador de estrés en RE.....	69
Figura 17. Imágenes de inmunofluorescencia en células HEK293 fijadas con metanol.....	71
Figura 18. Análisis por microscopía confocal de células HEK293.....	72
Figura 19. Comparación estadística de la actividad biológica entre co-cultivos.....	74
Figura 20. Cambios morfológicos en macrófagos inducidos por CD40L en co-cultivo.....	76
Figura 21. Análisis morfológico de macrófagos transfectados con los diferentes vectores.....	77

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Evasión inmune por oncoproteínas de VPH organizada por nodos mecanísticos..	14
Tabla II. Mecanismos de evasión por E5/E6/E7 y su vínculo con la vía CD40..	19
Tabla III. Mapeo de nodos de inmunoevasión por VPH y puntos de reversión por CD40.	28
Tabla IV. Ensayos clínicos de vacunas terapéuticas de ADN contra VPH.....	32
Tabla V. Vías ERAD y su relevancia para antígenos dirigidos al RE.....	41
Tabla VI. Estudios representativos de estrategias donde fusionan CRT con E6/E7.....	44
Tabla VII. Estudios con E7 de VPH dirigidos al RE (PS/KDEL)..	46
Tabla VIII. Casos representativos de adyuvancia.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
4-1BBL	Ligando de 4-1BB
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATF6	Factor 6 de transcripción activador del RE
BiP / GRP78	Inmunoglobulina de unión/ proteína regulada por glucosa de 78 kDa
CD	Célula dendrítica (también “cúmulo de diferenciación” según contexto)
CD1d	Molécula de presentación lipídica no clásica
CD40L	CD40 Ligando
CHOP	C/EBP HomoProteína homóloga a C/EBP
CIN2/3	Neoplasia intraepitelial cervical grados 2 y 3
CKII	Caseína quinasa II
CPA	Ciclofosfamida
CRT	Calreticulina
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
E2	Proteína viral temprana 2

E6/E7	Proteínas oncoproteicas virales tempranas 6 y 7 VPH
ECs	Células epidérmicas
EP	Electroporación
ERAD	Degradación asociada al RE
ERLAD	Degradación asociada al RE-lisosoma
ERQC	Control de calidad del RE
FHIT	Gen supresor tumoral FHIT
GM-CSF	Factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos
HLA-I	Antígeno leucocitario humano clase I
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HSP	Proteína de choque térmico
IDP	Proteína intrínsecamente desordenada
iNKT	Células T NK invariantes
IRE1	Enzima 1 que requiere inositol
IRES	Sitio interno de entrada del ribosoma
kDa	Kilodaltones
LC	Células de Langergans
LPS	Lipopolisacárido
LRP1B	Gen supresor tumoral LRP1B
LxCxE	Motivo de unión conservado a pRb en oncoproteínas virales
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MBD	Dominio de unión a membrana

MDSC	Células supresoras derivadas de mieloides
MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad clase I
MP	Micropartículas
MYC	Gen oncogénico MYC
NF-κB	Factor nuclear-κB
NR4A2	Gen nuclear NR4A2
OAd	Adenovirus oncolítico
OVA	Ovalbúmina
p38/MAPK	p38 / Proteína quinasa activada por mitógenos
p53	Proteína supresora tumoral 53
PBS	Buffer fosfato salino
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PERK	Quinasa tipo PKR del RE
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PLC	Complejo de carga de péptidos
pRb	Proteína del retinoblastoma
PS	Péptido señal
RE	Retículo endoplásmico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Sec61	Complejo translocón Sec61
SIINFEKL	Péptido inmunodominante
STING	Estimulador de genes de interferón

TC-1	Línea tumoral murina E7 ⁺
TLR	Receptores tipo Toll
TME	Microambiente tumoral
TNTs	Nanotubos de túnel
TRAF	Factores asociados al receptor del factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocitos T reguladores
TSA	Antígeno tumoral específico
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma Humano
WB	Western blot

RESUMEN

M.C.P Jesús Iván Martínez Ortega
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de titulación: Septiembre de 2025

Páginas en el estudio: 107

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

Título del estudio: Diseño y caracterización de vectores que dirigen la expresión del antígeno tumoral E7 flanqueado por señales de envío y retención en retículo endoplásmico en combinación con CD40L.

Introducción: En estudios previos hemos reportados que la inducción de una respuesta inmune antitumoral se ve favorecida si se dirigen los antígenos tumorales al retículo endoplásmico (RE) donde se cargan en moléculas de MHC-I. El antígeno E7 del VPH-16 es un antígeno tumoral relevante. Por otro lado, CD40L es un coestimulador clave para activar células presentadoras y polarizar respuestas Th1/CD8⁺. En este trabajo realizamos la construcción de vectores que dirigen la expresión del antígeno E7 (con señales de envío y retención al RE), en combinación con CD40L, con la finalidad de evaluar en un futuro si esta combinación será capaz de potenciar el procesamiento antigénico y la activación de la respuesta inmune.

Metodología: Se construyeron vectores de expresión PS-E7-KDEL, PS-E7-KDEL-IRES-CD40L y CD40L. La clonación se confirmó mediante digestión enzimática. Células HEK293 se transfectaron para evaluar la expresión de las proteínas de interés E7, CD40L, GRP78 y β -actina y la localización subcelular. La actividad biológica de CD40L se evaluó en macrófagos murinos RAW264.7 por la cuantificación de IL-12p70 mediante ELISA y un análisis de morfología celular. Los análisis estadísticos se realizaron en GraphPad Prism mediante pruebas t, ANOVA o no paramétricas según correspondiera.

Resultados: Células transfectadas con los vectores de interés (Ps-E7-KDEL, Ps-E7-KDEL-IRES-CD40L, CD40L y vector vacío) se caracterizaron con las enzimas *SspI/PvuII* ($\pm XmnI$) y electroforesis en gel. Además, se realizaron ensayos de inmunomarcaje para confirmar la localización subcelular de E7 en RE y CD40L en la membrana celular. La actividad biológica de CD40L se demostró en macrófagos mediante un co-cultivo (con células HEK293 o con RAW264.7) \pm LPS y una cuantificación de la IL-12p70 liberada al medio de cultivo, junto con cambios en su morfología propias de actividad fagosómica.

Conclusión: En los ensayos presentados se corroboró la correcta expresión del antígeno tumoral E7 flanqueado por señales de envío y/o retención en el retículo endoplásmico y el ligando CD40L. Su expresión fue confirmada en células HEK293, donde CD40L se localizó periféricamente y E7 en el RE. Además, el vector que codifica CD40L indujo una respuesta biológica en macrófagos murinos, demostrando su funcionalidad.



Dra. María de Jesús Loera Arias
Director de tesis

1. INTRODUCCIÓN

La infección por virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico (HR-VPH) es muy frecuente, pero la progresión a cáncer de cérvix o cáncer cervicouterino, es infrecuente, ya que la mayoría de los contagios se resuelven gracias a la respuesta inmune del huésped [1]. Cuando el ADN viral se integra en el genoma celular y se sobreexpresan de forma sostenida los oncogenes E6/E7, se desencadena la carcinogénesis cervical. La oncoproteína E7 del VPH-16 inactiva a la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (pRb) y favorece la proliferación descontrolada y la inestabilidad cromosómica [2].

Las vacunas de ADN son atractivas por su seguridad, estabilidad y capacidad de inducir respuestas CD8⁺ duraderas [3], pero su eficacia clínica se ha visto limitada por la baja presentación antigénica y la falta de señales coestimuladoras adecuadas [4]. Para mejorar estos aspectos se ha explorado el direccionamiento del antígeno al retículo endoplásmico (RE), [5], logrando respuestas CD8⁺ potentes y una disminución del crecimiento tumoral en modelos murinos [6, 7].

Por otra parte, CD40L (CD154), es expresada principalmente por linfocitos CD4⁺ activados y su uso en estudios previos mediante la co-administración con antígenos demostró la protección tumoral duradera dependiente de CD8⁺ [8], validando la co-entrega de un antígeno y la señal co-estimuladora en un solo constructo.

El presente trabajo busca diseñar y caracterizar vectores de ADN que codifiquen el antígeno E7 del VPH-16 fusionado a señales de envío y retención en retículo endoplásmico que co-expresen CD40L, con el objetivo de realizar a futuro las evaluaciones preclínicas de una inmunoterapia.

2. ANTECEDENTES

1.1 Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino (CaCu) o cáncer de cérvix es el cuarto cáncer más comúnmente diagnosticado en mujeres a nivel mundial, con aproximadamente 662,044 nuevos casos y 348,709 muertes en 2022, según estimaciones del proyecto GLOBOCAN 2022. Esto representa una tasa de incidencia ajustada por edad (ASIR) de 14.12 por 100,000 mujeres y una tasa de mortalidad ajustada (ASMR) de 7.08 por 100,000. China e India concentran el 42 % de los casos globales y el 39 % de las muertes. Aunque en países con alto índice de desarrollo humano (IDH) las tasas han disminuido, es preocupante el aumento de casos en mujeres jóvenes (menores de 40 años) en países en transición. Si las tasas actuales se mantienen, se proyecta un incremento del 56.8 % en los casos y del 80.7 % en las muertes para 2050. En respuesta, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha lanzado una estrategia global para eliminar el cáncer cervicouterino como problema de salud pública, definida como alcanzar una incidencia menor a 4 por cada 100,000 mujeres por año [9–13].

Diversos estudios han establecido una fuerte asociación entre el CaCu y la infección por el VPH, particularmente con los tipos de alto riesgo oncogénico, como el VPH-16 y el VPH-18, responsables de más del 70% de los casos (**Figura 1**). De hecho, se ha estimado que más del 99.7% de los cánceres cervicouterinos están relacionados con la infección persistente por VPH [12, 13]. En consecuencia, el comprender los mecanismos moleculares de acción y persistencia de este virus es fundamental para el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas eficaces.

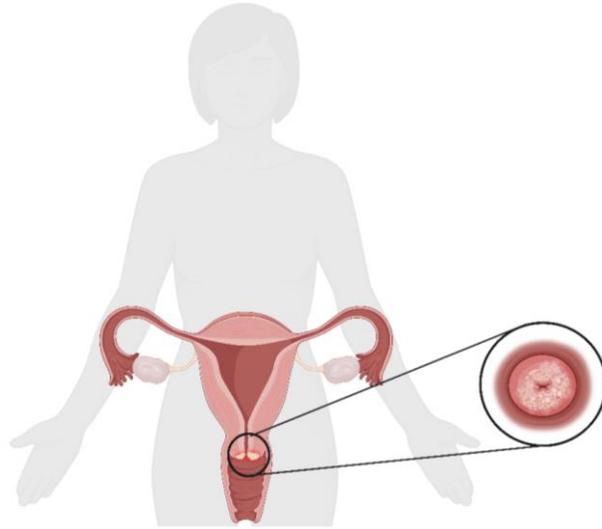


Figura 1. Representación esquemática del cáncer cervicouterino. A la izquierda, se muestra un esquema sagital del aparato reproductor femenino, en el que se señala con un círculo el cuello uterino afectado por una masa tumoral. A la derecha, se presenta una vista ampliada del cérvix observado desde una perspectiva inferior, como se vería a través de un espéculo o mediante colposcopia, donde se aprecia la lesión tumoral sobre la superficie ectocervical. Esta imagen ilustra los cambios morfológicos característicos del carcinoma cervicouterino invasor.

1.2 Virus del Papiloma Humano (VPH)

Como se mencionó anteriormente, los *papilomavirus* pertenecen a la familia Papillomaviridae, un grupo de virus pequeños, no envueltos, con un genoma de ADN bicatenario de entre 5.7 y 8.6 kb. Estos virus infectan exclusivamente vertebrados, incluidos mamíferos, aves, reptiles y peces, y muestran una notoria co-evolución con sus hospedadores durante millones de años [14].

Dentro de esta familia, el género Alphapapillomavirus incluye tipos que infectan preferentemente el epitelio mucocutáneo del tracto anogenital y orofaríngeo de humanos y primates. De manera relevante para la oncogenicidad, los tipos VPH-16 y VPH-18 han sido reconocidos como virus de alto riesgo, presentes habitualmente en tejido maligno, especialmente en cáncer cervical [12–14].

El VPH-16 es un virus pequeño, desnudo (sin envoltura lipídica), con una cápside de simetría icosaédrica. La cápside está formada por 72 capsómeros pentaméricos compuestos por proteínas L1, y contiene también copias menores del componente L2 (**Figura 2**), las cuales se asocian internamente y participan en el empaquetamiento del genoma viral de ADN bicatenario circular de aproximadamente 8 kb ($\approx 7.9\text{--}8.0$ kb) [15]. El ensamblaje de esta estructura es altamente dependiente de interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro que estabilizan la cápside durante la maduración viral [16].

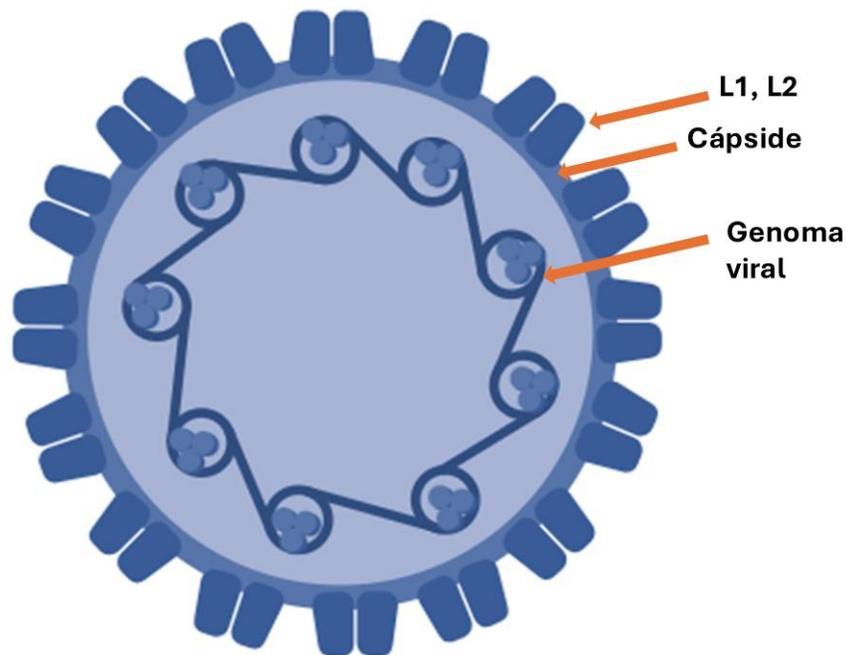


Figura 2. Estructura esquemática del Virus del Papiloma Humano (VPH). Representación del VPH como partícula viral no envuelta, con cápside icosaédrica compuesta por las proteínas estructurales L1 y L2, que protege un genoma de ADN bicatenario circular de aproximadamente 8 kb. Esta organización viral permite su entrada en células epiteliales basales y su replicación dependiente de la diferenciación celular. En el caso del VPH-16, el genoma codifica varias proteínas virales, entre ellas E6 y E7, asociadas con la transformación oncogénica.

Este virus exhibe un marcado tropismo por las células basales del epitelio escamoso estratificado, queratinizado o no, donde establece infecciones persistentes (**Figura 3**). Su ciclo replicativo está estrictamente acoplado a la diferenciación epitelial: la replicación inicial ocurre en la capa basal y la producción de viriones se completa en las capas superficiales. En la mayoría de los casos la infección genera lesiones benignas autolimitadas; sin embargo, la persistencia de genotipos de alto riesgo puede favorecer la integración del ADN viral en el genoma del huésped, un proceso multifactorial influido por tabaco, disbiosis cervicovaginal, niveles de estrógeno y coinfección por VIH [12, 13].

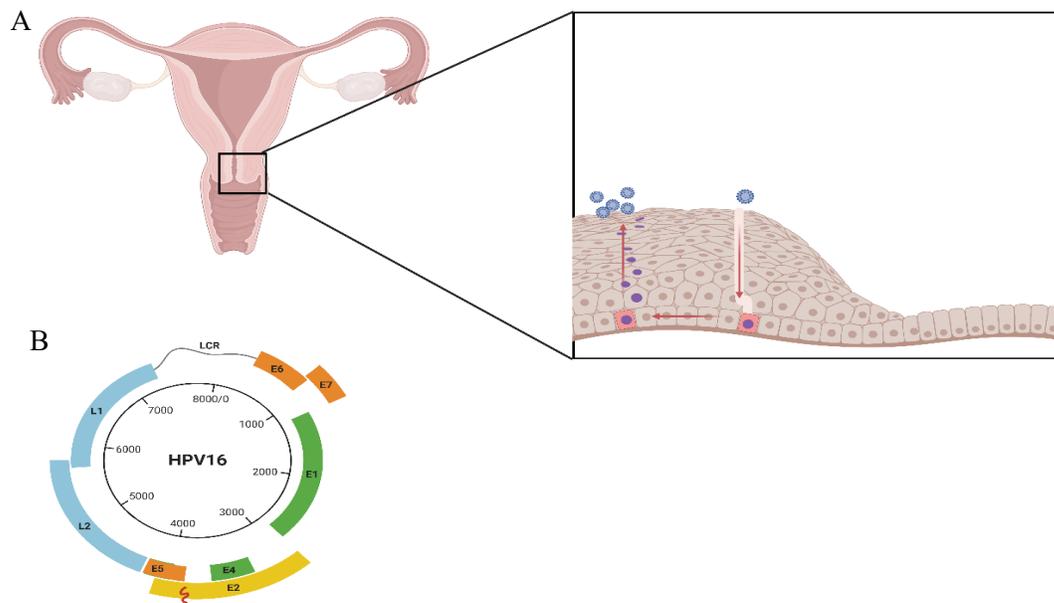


Figura 3. Esquema de la infección por VPH y representación del genoma de VPH-16. A) Sitio de infección y progresión epitelial. En la parte superior izquierda se muestra el tracto reproductivo femenino con énfasis en el cérvix uterino. El recuadro amplía el epitelio escamoso estratificado cervical, ilustrando cómo el VPH infecta las células basales (células rojas) tras microabrasiones. Las células infectadas migran hacia las capas suprabasales: durante esta diferenciación, se produce replicación viral (flecha azul ascendente) y ensamblaje de nuevos viriones (puntos azules). Eventualmente, los viriones se liberan por descamación (flecha rosa descendente). B) Organización génica del VPH-16. Diagrama circular del genoma de VPH-16 (~8 kb), con las regiones tempranas (E1–E7) y tardías (L1–L2) codificantes, y la región reguladora larga (LCR). Los genes E6 y E7 (naranja) son las principales oncoproteínas implicadas en la inactivación de p53 y pRb, respectivamente, E5 (naranja) también es considerada una oncoproteína. E1 y E2 (verde) participan en la replicación viral y regulación transcripcional, mientras que L1 y L2 (azul claro) codifican las proteínas de la cápside viral. La línea en zigzag señala la ruptura frecuente en el gen E2 durante la integración viral, lo cual libera la expresión de E6/E7 y contribuye a la transformación oncogénica.

La integración, presente en un 55 % de lesiones CIN2/3 y en > 90 % de carcinomas invasores, se produce con mayor frecuencia en sitios genómicos frágiles y suele interrumpir el gen E2, cuya pérdida desregula la expresión de E6/E7 y favorece la formación de super-potenciadores virales. El resultado es la sobreexpresión de E6/E7, la inactivación de p53 y pRb, y un entorno de inestabilidad genómica caracterizado por amplificaciones oncogénicas (por ejemplo, *MYC* y *NR4A2*), deleciones de supresores tumorales (como *FHIT* o *LRP1B*) y reordenamientos cromosómicos complejos. Este escenario, sumado a la modulación del microambiente inmune por E6/E7, impulsa la transición de una lesión premaligna a un carcinoma invasor [12, 17].

Entre los genes virales transformantes destaca E7, considerado un antígeno tumoral específico (TSA) por su expresión restringida a células transformadas [18]. E7 secuestra a los complejos E2F-pRb y promueve la entrada permanente en fase S, facilitando la acumulación de mutaciones y la proliferación descontrolada que caracteriza al cáncer cervical [17].

1.2.1 Proteína E7 del VPH-16

La proteína E7 del VPH constituye una oncoproteína fundamental en la transformación celular y en la alteración del control del ciclo celular. Codificada por el gen E7, esta proteína tiene una longitud aproximada de 100 aminoácidos y un peso molecular cercano a 10 kDa. Su estructura incluye tres dominios (CD1, CD2 y CD3) con homología significativa a la proteína E1A del adenovirus, lo cual sugiere una conservación funcional asociada a la transformación oncogénica [19, 20]. El extremo carboxilo-terminal de E7 contiene un motivo

estructural tipo "dedo de zinc" (Cys-X-X-Cys), indispensable tanto para su dimerización como para su función oncogénica [21].

En contraste, la región amino-terminal de E7 carece de una estructura fija, siendo intrínsecamente desordenada, lo que le confiere una notable flexibilidad conformacional y capacidad para interactuar con una amplia gama de proteínas celulares. En esta región se localiza el motivo LxCxE, crítico para su unión con la pRb [22]. Además, la fosforilación de residuos en el dominio N-terminal por la caseína quinasa II (CKII) modula la conformación local y estabiliza una estructura extendida tipo poliprolina II, lo que incrementa su afinidad por pRb y potencia su actividad oncogénica [22]. También se ha demostrado que este dominio presenta una notable plasticidad estructural y de reconocimiento, contribuyendo a su versatilidad funcional [23]. Esto se debe a que el dominio N-terminal de E7 es intrínsecamente desordenado, una característica que le confiere la capacidad de adoptar múltiples conformaciones al interactuar con diferentes proteínas celulares. Lejos de representar un defecto estructural, este desorden es una ventaja evolutiva que permite a E7 cumplir funciones diversas y adaptarse a distintos contextos celulares. Así, el dominio N-terminal actúa como un centro multifuncional, cuya actividad se ve finamente modulada por modificaciones postraduccionales como la fosforilación por CKII. Las mutaciones que impiden esta fosforilación no solo disminuyen su afinidad por pRb, sino que también alteran la regulación de promotores virales dependientes de la diferenciación epitelial [24], evidenciando que esta región participa tanto en la transformación celular como en el control del ciclo de vida viral. Por tanto, la flexibilidad estructural del dominio N-terminal no solo permite la evasión de controles celulares, sino que también representa un punto vulnerable que podría explotarse terapéuticamente (**Figura 4**).

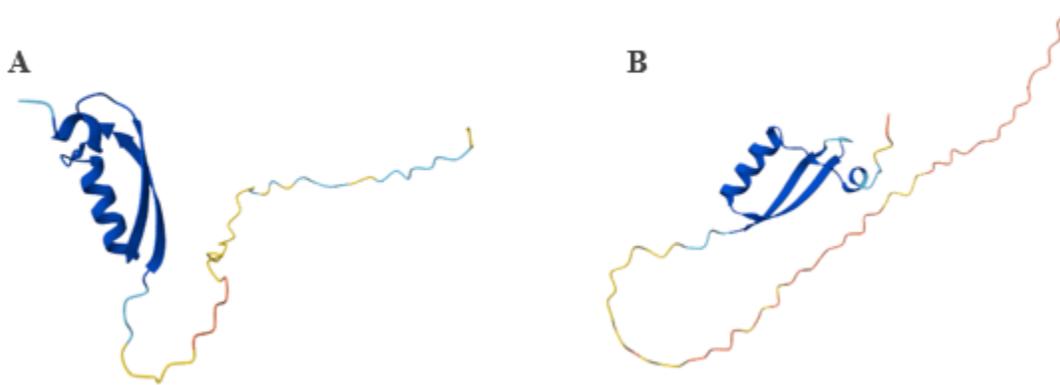


Figura 4. Comparación de estructuras de la oncoproteína E7 de VPH-45 y VPH-16. Predicción completa de la proteína E7 de VPH-16 obtenida de AlphaFold3 (acceso: agosto 2025). La región N-terminal plegada (hélices y láminas β) se muestra en azul, y el resto de la cadena en degradé de azul claro a rojo para reflejar la confianza en la predicción. Versión silvestre o wild type (A) y mutante, usada en este proyecto (B).

La interacción con pRb se produce principalmente a través del motivo LxCxE, que proporciona la mayor parte de la energía de unión, aunque el dominio C-terminal también contribuye mediante un mecanismo de doble contacto. Se ha demostrado que E7 puede unirse a pRb en forma de monómero, y que esta afinidad es más alta en los genotipos de alto riesgo del VPH [22]. Esta unión promueve la liberación de los factores de transcripción E2F, desencadenando una progresión del ciclo celular sin control y favoreciendo la transformación maligna [21]. Además, esta interacción no solo inhibe la función de pRb, sino que también conduce a su degradación proteolítica, afectando a otros miembros de su familia, como p107 y p130 [20].

Con base en esta evidencia estructural y funcional, en nuestros experimentos hemos empleado una versión doble mutante de E7, que contiene mutaciones puntuales en el motivo LxCxE (por ejemplo, Cys24Gly y Glu26Gly, según se ha descrito en la literatura para abolir la unión a pRb). Este constructo mutante nos permite discriminar los efectos dependientes de la interacción E7-pRb de aquellos mediados por otras funciones de E7. En el siguiente

modelaje por AlphaFold, se ilustra la interacción entre la E7 silvestre (WT) y pRb, en comparación con la E7 doble mutante (E7-DM). Nótese cómo en el complejo E7-WT se mantienen los contactos críticos entre el motivo LxCxE y el bolsillo de unión de pRb, mientras que en E7-DM dichas interacciones se pierden, evidenciando el impacto directo de estas mutaciones sobre la afinidad del complejo (**Figura 5**).

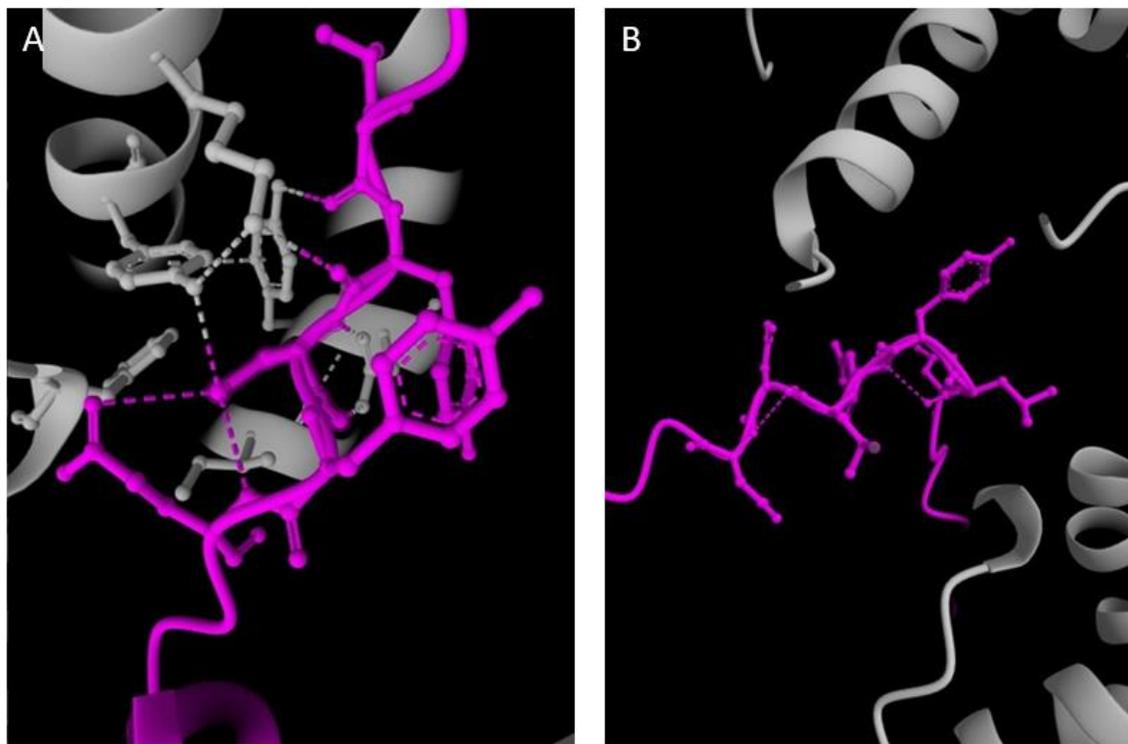


Figura 5. Interacción del motivo LXCXE de E7 con pRb. (A) Modelado por AlphaFold de la proteína E7 (magenta) con el dominio pocket de pRb (gris), el motivo LXCXE establece contactos fisicoquímicos clave, incluyendo puentes de hidrógeno entre Cys24/Glu26 y residuos del dominio pocket de pRb (ej. Tyr709, Lys722), que estabilizan la unión E7–pRb. (B) En cambio en E7 doble mutante (C24GΔE26G) del VPH (magenta), en el que se aprecia la pérdida del motivo de unión a pRb (gris). La sustitución de Cys24 y Glu26 interrumpe la conformación funcional del motivo LXCXE, aboliendo la interacción con pRb.

1.2.2 Respuesta inmune antiviral

La respuesta inmune antiviral frente al VPH, especialmente en las mucosas del tracto urogenital, está condicionada por la organización del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y por la capacidad del virus para evadir tanto la inmunidad innata como la adaptativa. A diferencia de otros sitios mucosos como el intestino, el MALT genital carece de estructuras linfoides organizadas, lo cual limita la eficiencia de la respuesta inmune local [25].

En el epitelio escamoso estratificado (SSE) de las mucosas tipo II (p. ej., ectocervix y vagina) conviven varias poblaciones dendríticas intraepiteliales. Además de las células de Langerhans (LC) residentes (población intraepitelial dominante en estado basal), pueden detectarse DC intraepiteliales no-LC (descritas como VEDCs/CD11c⁺), cuya frecuencia aumenta bajo inflamación; asimismo, DC dérmicas pueden infiltrar el epitelio en ese contexto. En la lámina propia subyacente predominan DC convencionales (cDC) y, durante la inflamación, monocitos CCR2⁺ pueden diferenciarse localmente a MoDC [26, 27].

Las células presentadoras de antígenos residentes en el epitelio escamoso son clave en la detección inicial del VPH y en la activación de la inmunidad adaptativa. Sin embargo, el VPH ha desarrollado estrategias para inhibir la activación, maduración y migración de las LC, lo que conlleva una presentación antigénica deficiente y una respuesta T subóptima [28–30]. Específicamente, el virus evita la inducción de moléculas coestimuladoras (como CD80/CD86), la secreción de citocinas proinflamatorias (como IL-12), y obstaculiza la migración de las LC hacia los ganglios linfáticos, bloqueando así el inicio efectivo de la activación de linfocitos T específicos [29, 30].

En condiciones fisiológicas, la activación de linfocitos Th1 (CD4⁺) es esencial para inducir la producción de IFN- γ e IL-2, promoviendo así la expansión de CTL (CD8⁺) y células NK. No obstante, la inhibición de las LC y la falta de inflamación local dificultan la generación de una respuesta Th1 robusta, permitiendo al virus escapar de la vigilancia inmunológica [25, 29–32].

1.2.3 Evasión molecular mediada por oncoproteínas del VPH

La oncoproteína E5 contribuye de forma destacada a la evasión inmune en dos módulos: procesamiento/presentación de antígeno por MHC-I y sensores de interferón. A nivel de procesamiento, E5 inhibe la función del inmunoproteosoma, lo que reduce la cantidad y diversidad de péptidos adecuados para carga en MHC-I y, en consecuencia, merma el reconocimiento por linfocitos T citotóxicos. En paralelo, interfiere la vía STING y atenúa las respuestas de interferón tipo I, estableciendo un tono antiviral bajo que favorece la persistencia viral [33, 34]. Más allá del repertorio peptídico, E5 disminuye la expresión de HLA-I en superficie por retención en el retículo endoplásmico/Complejo de Golgi y la asociación con la cadena pesada (implicando chaperonas como calnexina), lo que limita la presentación de antígenos a CTL incluso cuando hay péptidos disponibles [35]. Además, E5 reduce CD1d en queratinocitos, debilitando la vigilancia de iNKT y añadiendo otra capa de escape frente a la inmunidad innata-adaptativa [36]. En conjunto, estos efectos: menos péptidos adecuados, menos MHC-I funcional en superficie y menos presentación por CD1d, convergen en un fenotipo de baja visibilidad inmunológica de las células infectadas.

En VPH-16, E6 interfiere las respuestas de IFN-I al unirse a IRF3, lo que inhibe la inducción de IFN- β ; simultáneamente, la inactivación de p53 reduce la transcripción de genes de

respuesta inmune dependientes de p53, reforzando la pérdida de vigilancia sobre células infectadas [37–39]. Como extensión de este nodo de sensores, se ha descrito que además E6/E7 reprimen la transcripción de TLR9 en queratinocitos, disminuyendo la “alarma” frente al ADN viral, contribuyendo a un entorno menos inflamatorio [40].

Estos mecanismos son complementarios: el bloqueo de IRF3/IFN- β y la represión de TLR9 actúan en puntos distintos de la detección de ADN (uno en factores de transcripción de salida del eje, el otro en el PRR de entrada), y no deben interpretarse como meras duplicaciones de la misma vía.

La oncoproteína E7 antagoniza la activación de NF- κ B ante estímulos inflamatorios en queratinocitos (por ejemplo, imiquimod), lo que se traduce en disminución de citocinas proinflamatorias y menor reclutamiento de efectores; además, altera la función y migración de células presentadoras de antígeno (LC/DC) y favorece un microambiente inmunosupresor con expansión de T reguladoras [35, 37–39, 41, 42]. En el modelo K14.E7 (expresión de E7 en queratinocitos), la interacción E7–Rb se asocia con hiperplasia epitelial, menor reclutamiento de APC a los ganglios drenantes y maduración deficiente de DC migratorias; a pesar de que los queratinocitos con Rb mutante (sin capacidad de unión a E7) son lisables por CTL *in vitro*, los injertos cutáneos no se rechazan *in vivo*, lo que revela un microambiente regional que amortigua la inmunidad efectiva [43].

A estos ejes se suman dos piezas recientes de interés de señalización. Primero, en VPH-18, E7 se une directamente a STING y bloquea de forma selectiva la rama NF- κ B de la señalización inducida por STING (con menor impacto en IRF3), lo que demuestra modulación de ramas específicas dentro del mismo PRR y esto ayuda a explicar la atenuación de respuestas inflamatorias aun cuando persistieran salidas por IRF3 [44].

Segundo, E7 silencia la quimiocina CXCL14 (vía hipermetilación promotora); la reexpresión de CXCL14 en modelos de cáncer de cabeza y cuello VPH⁺ restaura el control inmune en animales inmunocompetentes, con aumento de NK y CD8⁺ en ganglios drenantes y supresión del crecimiento tumoral, subrayando el papel de CXCL14 como eje de quimioatracción y activación local [45]. Estos mecanismos se resumen en la **Tabla I**.

Onco-proteína	Nodo diana	Mecanismo proximal demostrado	Medidas de la respuesta inmune	Consecuencia tisular / sistémica	Referencias
E5	Procesamiento antigénico (inmuno-proteasoma)	Inhibición del inmunoproteasoma que restringe el repertorio de péptidos aptos para MHC-I	Disminución de péptidos presentables; menor activación de CTL	Menor reconocimiento citotóxico y mantenimiento de células infectadas	[33]
	Sensores de IFN (STING / IFN-I; IFN-κ en queratinocitos)	Interferencia de STING y atenuación de IFN-I; inhibición de IFN-κ	Reducción de IFN-β/ISG; tono antiviral basal bajo	Facilita persistencia episomal y evasión de la inmunidad innata	[33, 34]
	Tráfico y superficie de MHC-I	Retención de HLA-I en RE/Golgi (interacción con cadena pesada; chaperonas como calnexina)	Disminución de HLA-I en superficie	Escape a CTL incluso con antígeno disponible	[35, 42]
	Presentación CD1d / iNKT	Disminución de CD1d en queratinocitos	Menor activación de iNKT	Pérdida de vigilancia iNKT	[36, 42]
E6	IFN-I (IRF3)	Unión directa de E6 (VPH-16) a IRF3 con bloqueo de inducción de IFN-β	Reducción de IFN-β y de genes estimulados por IFN	Disminuye vigilancia antiviral sobre células infectadas	[38–40]
	p53-inmune	Inactivación de p53 y pérdida de transcripción de genes inmunes p53-dependientes	Menor expresión de efectores inmunes inducidos por p53	Menor reconocimiento y eliminación de células infectadas	[37, 39]
E6/E7	PRR de ADN (TLR9)	Represión transcripcional de TLR9 en queratinocitos	Disminución de citocinas/IFN ante ADN viral	Menor alarma innata en epitelio	[37, 42]
E7	NF-κB inflamatorio (queratinocito)	Antagonismo de la activación por estímulos como imiquimod	Disminución de citocinas proinflamatorias; menor	Microambiente con menor infiltración y respuesta innata débil	[41, 42]

			reclutamiento de efectores		
	APC (LC/DC) y co-estimulación	Disfunción y migración alteradas de APC; sesgo regulador; reducción de IL-12	Presentación subóptima; menor activación T	Persistencia de la infección y respuestas adaptativas débiles	[42, 43]
	cGAS-STING (rama NF-κB)	Unión de E7 (VPH-18) a STING con bloqueo selectivo de la salida NF-κB	Reducción de quimiocinas/inflamación dependientes de NF-κB con IRF3 relativamente preservado	Atenuación de inflamación incluso con detección de ADN	[44]
	Quimioatracción tisular (CXCL14)	Silenciamiento epigenético de CXCL14	Menor reclutamiento de DC/NK; descenso de MHC-I	Reexpresión de CXCL14 restaura control inmune y suprime crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	[45]
E7-Rb	Efecto tisular regional (modelo K14.E7)	Interacción E7-Rb con hiperplasia y cambios locales	Menor llegada de APC a ganglios; maduración deficiente de DC migratorias	No rechazo de injertos <i>in vivo</i> pese a lisis <i>in vitro</i>	[46]

Tabla I. Evasión inmune por oncoproteínas de VPH organizada por nodos mecanísticos. La tabla sintetiza cómo E5, E6 y E7 contribuyen a la evasión inmune agrupando la evidencia por nodo diana (punto de la vía donde actúa la oncoproteína), mecanismo proximal (evento molecular inmediato), medidas de la respuesta inmune (cambios medibles en expresión/señalización o ensayos funcionales) y consecuencia tisular/sistémica (efectos en epitelio, ganglio o modelos *in vivo*). Los nodos listados no son redundantes: cubren capas distintas (procesamiento y tráfico antigénico, sensores de IFN, transducción inflamatoria, quimioatracción y dinámica de APC), aunque puedan converger en fenotipos similares. La fila “E7-Rb” resume el efecto tisular regional observado en el modelo K14.E7. **Notas:** 1. “Retención de HLA-I en RE/Golgi” incluye interacciones con la cadena pesada y chaperonas (p. ej., calnexina). 2. El efecto de E7 sobre STING descrito para VPH-18 se reporta como bloqueo selectivo de la rama NF-κB, con menor impacto en la salida IRF3. 3. “Silenciamiento de CXCL14” alude a regulación epigenética con implicaciones en reclutamiento de DC/NK y control tumoral *in vivo*.

1.2.4 Nuevos mecanismos de evasión: inhibición del eje CD40-CD40L

En condiciones fisiológicas, la ligación CD40-CD154 en el epitelio activa un programa transcripcional proinflamatorio (p. ej., IL-8, TNF) y favorece el reclutamiento leucocitario [46, 47] (**Figura 6**). En la infección epitelial no transformada (fase temprana o persistente) por VPH, esta respuesta a CD40 está atenuada, con disminución de quimiocinas y menor atracción de células inmunes [46, 48]. De forma complementaria, E6 (VPH-16/18) reduce

CD40 mediante el eje p53–AKNA dependiente de proteasoma, aportando un mecanismo directo de desregulación coestimuladora [49].

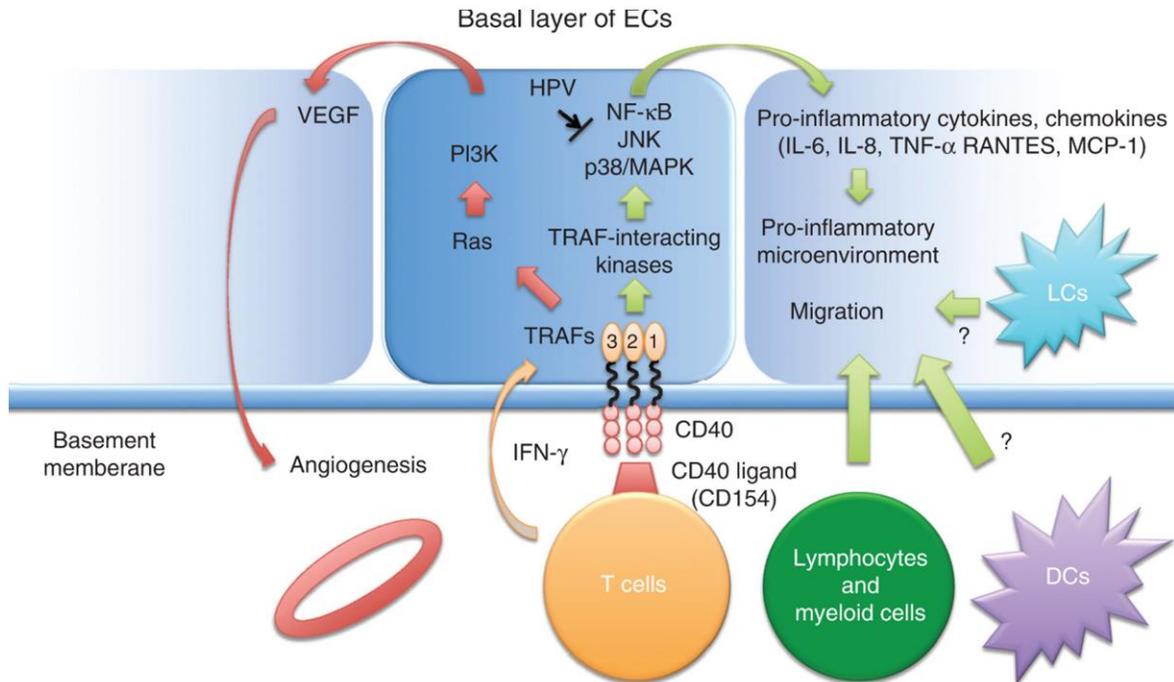


Figura 6. Posibles respuestas en células endoteliales mediante la activación de CD40. Las ECs que expresan CD40 inducido por IFN- γ pueden interactuar con linfocitos T activados que expresan el ligando de CD40 (CD154). La unión de CD40 provoca cambios conformacionales que reclutan moléculas adaptadoras conocidas como TRAFs. Los TRAFs reclutan quinasas que interactúan con TRAF y activan las vías de señalización NF- κ B, p38/MAPK y JNK. La señalización de CD40 induce la producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias necesarias para la migración de células inmunitarias como las células de Langerhans (LCs), las células dendríticas (DCs) y los leucocitos, lo que conduce al establecimiento de un microambiente proinflamatorio. El virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR) interfiere con la señalización de CD40 y atenúa estas respuestas. La unión de CD40 también induce la activación de Ras y PI3K, lo que lleva a la producción de VEGF, que puede promover la angiogenesis en la dermis. Adaptación [48].

Por el contrario, en el carcinoma cervical establecido, CD40 suele encontrarse sobreexpresado y su activación con CD40L mejora el procesamiento y la presentación antigénica por MHC-I cuando los epítomos son dependientes de TAP, lo que se asocia con mayor lisis por CTL; en contraste, esto no ocurre frente a epítomos TAP-independientes.

Además, determinados quimioterapéuticos incrementan la apoptosis inducida por CD40L en células tumorales cervicales. Todo ello enlaza la señalización epitelial de CD40 con la eficiencia del reconocimiento por CTL en tumores VPH⁺ [50].

Mecanísticamente, la estimulación de la vía de CD40 induce TAP-1, TAP-2 y tapasin, y eleva subunidades del inmunoproteasoma (al menos LMP2 y LMP10/MECL-1) mediante NF- κ B e IRF-1. NF- κ B predomina en la fase temprana y la síntesis de novo de IRF-1 sostiene la inducción máxima en fases tardías. En conjunto, esto restaura la vía clásica de MHC-I (generación proteasomal, transporte mediante TAP al retículo endoplásmico, carga en MHC-I y presentación en superficie), reforzando el vínculo funcional entre CD40 y la inmunovigilancia mediada por CD8⁺ [50–52].

Se ha reportado que queratinocitos VPH-16⁺ que expresan E7 liberan microvesículas con efecto inmunosupresor: en co-cultivo con LC humanas o murinas, disminuyen CD40 y la subunidad p40 de IL-12, mermando la capacidad de las LC para activar CTL específicos [53]. Por tamaño y cinética, estas microvesículas pueden actuar localmente y alcanzar el drenaje linfático, condicionando la función de APC en tránsito hacia el ganglio (**Figura 7**).

En sentido opuesto, no todo material particulado es inmunosupresor: en un modelo con DC murinas cargadas *ex vivo* con microesferas recubiertas con E7, las DC positivas a microesferas que migraron al ganglio drenante mostraron mayor expresión de CD40 a las 36 h. Aunque este sistema experimental no demuestra dependencia obligada de CD40 ni es directamente extrapolable a la infección natural, apunta a que la forma física del antígeno y las señales coestimuladoras pueden modularse de manera coordinada [54].

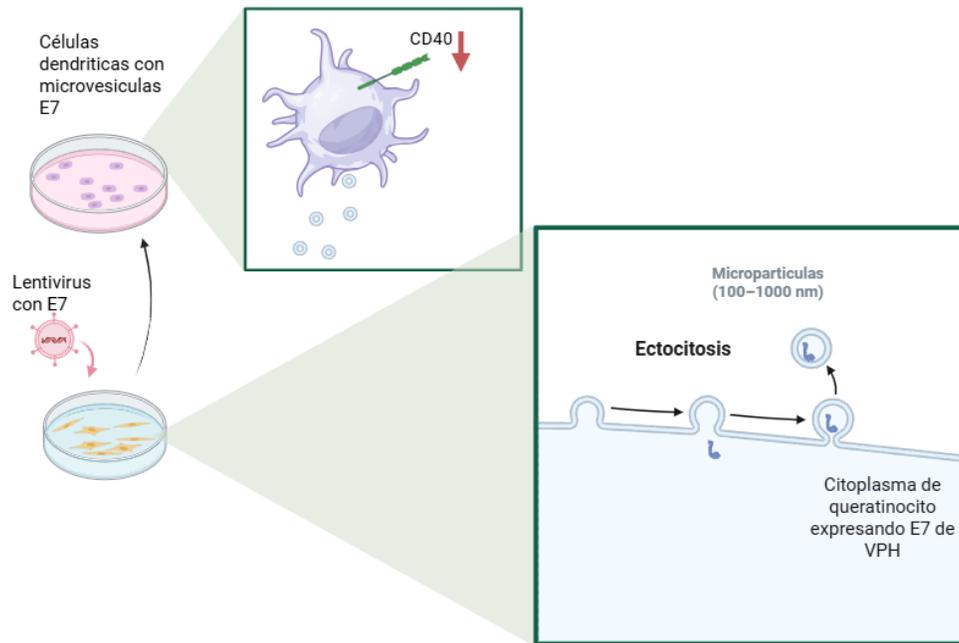


Figura 7. Micropartículas derivadas de queratinocitos que expresan E7 y su efecto en CD40. Esquema del experimento usando queratinocitos transducidos con un lentivirus que expresa E7 y liberan micropartículas (100–1000 nm) por ectocitosis. Estas micropartículas son captadas por células dendríticas/Langerhans derivadas de médula ósea (cuadro verde). Tras la exposición a micropartículas con E7 y estimulación con LPS, las DC mostraron disminución de ~50% de CD40 en superficie y reducción de IL-12p40; en contraste, otras moléculas coestimuladoras como CD86 aumentaron. En un ensayo funcional (no mostrado), DC cargadas con el péptido SIINFEKL (OVA) y co-cultivadas con micropartículas E7 generaron >50% menos citotoxicidad de CD8⁺ OT-1 frente a controles, indicando que las micropartículas con E7 inhiben la primación de efectores citotóxicos. En conjunto, la figura ilustra una vía de evasión inmune mediada por micropartículas ricas en E7 que atenúan la señal CD40–CD40L y la producción de IL-12, con posibles implicaciones para la presentación cruzada en piel.

En los ganglios drenantes, la ayuda CD4⁺ promueve el influjo de monocitos CCR2⁺ y su diferenciación local a MoDC con aumento de CD40, CD80 y PD-L1; este proceso depende de CD40L–CD40 e IFN- γ , y sostiene la expansión de CD8⁺ efector y la polarización Th1 (29). En conjunto, los datos muestran que el VPH interfiere el licenciamiento coestimulador en múltiples compartimentos (epitelio, LC/DC y ganglio), mientras que la activación epitelial de CD40 (cuando no está suprimida) restaura el procesamiento/presentación MHC-I TAP-dependiente y sensibiliza al tumor a CTL, ofreciendo puntos de intervención combinada con TLR/IFN y, en contexto terapéutico, con quimioterapia [50].

En la **Tabla II** se sintetizan los mecanismos de evasión mediados por E5, E6 y E7 y se comparan con el eje CD40–CD40L descrito en esta sección, a fin de ofrecer un panorama cohesivo de los nodos afectados y de los puntos donde CD40 puede actuar como mecanismo compensatorio.

Nodo mecanístico	E5	E6	E7	Relación con la vía CD40	Referencia
Maquinaria de procesamiento antigénico (APM) y MHC-I	Inhibe el inmuno-proteasoma y restringe el repertorio peptídico	—	Interferencia indirecta vía microambiente y APC	En epitelio tumoral, CD40 induce TAP-1, TAP-2 y tapasin y eleva subunidades del inmunoproteasoma; mejora MHC-I dependiente de TAP y la sensibilidad a CTL	[33, 34, 50–52]
Tráfico y superficie de MHC-I	Retención de HLA-I en RE/Golgi (interacción con cadena pesada; chaperonas)	—	—	La activación de CD40 puede restaurar APM y favorecer presentación en MHC-I	[35, 50–52]
Presentación CD1d / iNKT	Disminución de CD1d en queratinocitos	—	—	Un entorno epitelial más inflamatorio y coestimulador vía CD40 podría potenciar vigilancia innata-adaptativa	[36, 46–48]
Sensores de ADN / IFN-I (TLR9; cGAS–STING; IFN-κ)	Interferencia de STING/IFN-I; reducción de IFN-κ en queratinocitos	Unión de E6(16) a IRF3 e inhibición de IFN-β; inactivación de p53; represión de TLR9	Unión de E7(VPH-18) a STING con bloqueo selectivo de la salida NF-κB	CD40 no es PRR, pero su activación puede compensar señales inflamatorias y coestimulación cuando PRR están atenuados	[33–35, 37–40, 44, 46–52]
Transducción inflamatoria (NF-κB en queratinocito)	—	—	Antagonismo de la activación por imiquimod; disminución de citocinas y del reclutamiento	En epitelio sano, CD40–CD154 induce quimiocinas; en epitelio VPH ⁺ esta amplificación está atenuada	[41, 46–48]
APC locales (LC/DC) y coestimulación	—	—	Disfunción y migración alteradas; reducción de	Microvesículas derivadas de E7 disminuyen CD40 e IL-12p40 en LC; en	[27, 53]

			IL-12; expansión de T reguladoras	ganglio, CD40L–CD40 e IFN- γ favorecen MoDC con CD40 alto y sostienen expansión CD8 ⁺ y polarización Th1	
Eje epitelial CD40 (expresión y función)	—	Reducción de CD40 vía p53–AKNA (mecanismo directo)	Posible contribución a atenuación inflamatoria	En infección no transformada la respuesta a CD40 está disminuida; en carcinoma cervical CD40 suele estar sobreexpresado y su activación mejora APM/MHC-I y lisis por CTL	[46–50]
Micro-ambiente tumoral y estroma	—	—	El modelo K14.E7 muestra un microambiente que amortigua la inmunidad efectiva	Activar CD40 en células tumorales cervicales facilita el reconocimiento por CTL y potencia la apoptosis con quimioterapia	[43, 50]
Quimio-atracción y nicho inmune (p. ej., CXCL14)	—	—	Silenciamiento de CXCL14 reduce el reclutamiento de DC/NK; su reexpresión restaura el control	La amplificación epitelial dependiente de CD40 incluye quimiocinas; su atenuación por VPH puede limitar el reclutamiento de efectores	[45–48]

Tabla II. Mecanismos de evasión por E5/E6/E7 y su vínculo con la vía CD40. La tabla organiza los efectos de E5, E6 y E7 por nodo mecanístico y los relaciona con la señalización CD40–CD40L en epitelio, APC y ganglio.

La literatura coincide en que, aunque la mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y resueltas por la inmunidad celular, la evasión inmune del virus es crucial en la persistencia y progresión a cáncer cervical [31, 32]. En concordancia, la manipulación experimental de rutas de detección/activación de APC ilustra los nodos afectados por las oncoproteínas: por ejemplo, LC expuestas a VPH-16 no recuperan su programa inflamatorio con imiquimod (TLR7), mientras agonistas TLR8 como 3M-002 o duales TLR7/8 como resiquimod restauran citocinas, migración dirigida y activación de CD8⁺ [29]. A la vez, E7 puede inhibir respuestas inducidas por imiquimod mediante un mecanismo independiente de TLR7 [41],

subrayando que la evasión viral opera en nodos redundantes y convergentes. En conjunto, estos ejemplos ejemplifican la interferencia del VPH sobre motores clave de la inmunidad antiviral y delimitan las rutas (p. ej., TLR7/8, STING, CD40–CD40L) que se discutirán más adelante.

1.3 Terapia génica en VPH

La terapia génica consiste en la introducción de material genético en un organismo utilizando diversos vectores, como liposomas, vectores adenovirales o métodos físicos como la biobalística [55]. Esta última, también conocida como gene gun, es una técnica no viral que emplea la aceleración de partículas de oro recubiertas con ADN mediante presión generada por gas helio, permitiendo que estas impacten a alta velocidad sobre el tejido epidérmico y penetren en las células de la piel [56]. Una vez dentro, la maquinaria celular transcribe y traduce el ADN, expresando la proteína de interés, que puede interactuar con diferentes vías celulares para cumplir el objetivo terapéutico.

La biobalística ha demostrado ser eficaz para la transfección de una amplia variedad de tipos celulares, tanto en cultivos primarios como en líneas establecidas, y puede emplearse para la entrega de ADN, ARN, microARN y proteínas [57]. En modelos murinos de melanoma, la vacunación con ADN mediada por biobalística ha inducido respuestas inmunitarias específicas contra antígenos tumorales como TRP2, generando linfocitos T específicos y anticuerpos, asociados a inmunidad antitumoral y fenómenos de despigmentación cutánea tipo vitíligo [58].

Las estrategias de terapia génica basadas en vectores y ADN para el tratamiento del VPH se centran en vacunas de ADN terapéuticas que codifican E6 y E7 de tipos de alto riesgo, especialmente VPH-16 y VPH-18, con el fin de inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos que eliminen células infectadas o transformadas. Entre las más destacadas se incluyen:

1. Vacunas de ADN convencionales: vectores que codifican E6 y E7, optimizados para expresión en células humanas y fusionados a secuencias que mejoran la presentación antigénica (HSP70, calreticulina, gD de herpesvirus). Ejemplos como VGX-3100 y GX-188E han mostrado eficacia en la regresión de lesiones intraepiteliales de alto grado y eliminación viral [59–64].
2. Vectores que generan VLPs: diseñados para producir partículas similares a virus que presentan E7, lo que activa células dendríticas y la respuesta T, con resultados potenciados al combinarse con agonistas de TLR7/TLR9 [65].
3. ADN minicircular: vectores de ADN no viral sin secuencias bacterianas, con mayor eficiencia de transfección y expresión sostenida; en modelos de cáncer cervical por VPH-18 inducen apoptosis y arresto celular [66].
4. Estrategias de combinación: uso conjunto de vectores de expresión de antígenos y citocinas inmunomoduladoras (como IL-2), optimización de secuencias y vías de administración e integración con inmunoterapia (anti-PD-1) o vectores virales recombinantes para lograr sinergia en la erradicación tumoral [64, 67].
5. Fusión con secuencias vegetales o adyuvantes naturales: para mejorar inmunogenicidad, combinando vectores con compuestos naturales inmunomoduladores [68].

6. Vacunas de ARNm en LNP: las vacunas de ARNm-LNP codifican E6/E7 (y en algunos diseños, E2) y se formulan en nanopartículas lipídicas (LNP) compuestas típicamente por lípido ionizable, colesterol, fosfolípido ayudante (p. ej., DSPC) y PEG-lípido, lo que protege el ARNm, facilita la endocitosis y el escape endosomal. Tanto ARNm autoamplificante como ARNm no replicativo en LNP han mostrado, con una sola dosis, control de tumores asociados a VPH, CD8⁺ específicos frente a E7 robustos y memoria duradera en modelos murinos [69–71]. La combinación de antígenos (E2/E6/E7) y la co-formulación o coadministración con inmunoestimuladores de ácidos nucleicos (p. ej., CpG 1018, poly(I:C)) potencian la maduración de DC, la migración a ganglio y la remodelación del microambiente, con sinergia con ICB [72, 73].
7. Vectores virales (adenovirus, MVA, AAV): los adenovirus no replicativos (p. ej., Ad26, Ad35) han sido ampliamente usados para expresar E6/E7/E2, introduciendo mutaciones/reordenamientos que anulan la actividad transformante. Inducen inmunogenicidad T robusta y eficacia terapéutica en modelos preclínicos, con escalabilidad industrial [74, 75]. Además, se han empleado como vehículos para siRNA/miRNA y como oncolíticos en escenarios específicos (76). MVA aporta un perfil de seguridad elevado y fuerte inmunidad celular; AAV ofrece baja inmunogenicidad y expresión sostenida, aunque hay menos datos publicados en VPH que para adenovirus y ARNm-LNP [75].

En cuanto a su administración, las vacunas de ADN se han aplicado por vía intramuscular, intradérmica y mediante electroporación o biobalística, buscando maximizar la captación y expresión del ADN en células presentadoras de antígeno [59, 61, 62, 76] (**Figura 8**).

Principales estrategias de vacunación para el VPH

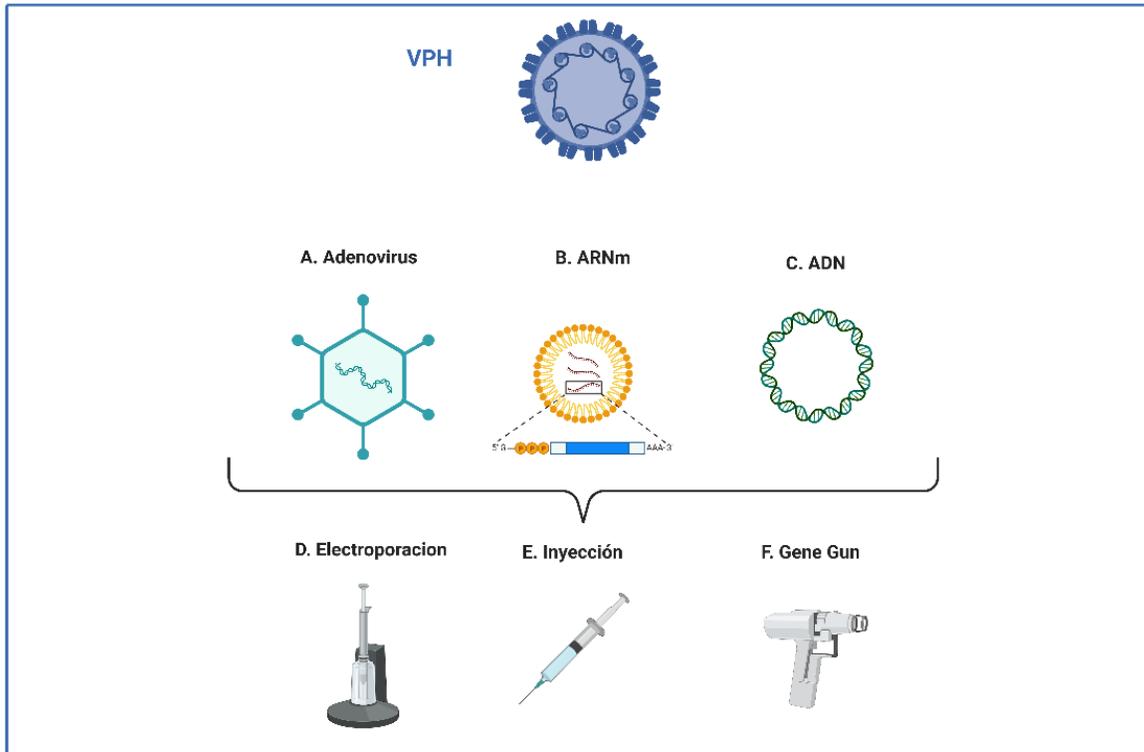


Figura 8. Estrategias de vacunación frente al VPH y métodos de entrega. Esquema de plataformas genéticas para expresar antígenos de VPH (p. ej., E6/E7) y vías físicas de administración. A) Adenovirus: vector viral que transporta ADN y dirige la expresión del antígeno en células del hospedero; habitualmente se administra por inyección (E). B) ARNm en LNP (lipid nanoparticles, nanopartículas lipídicas): el ARNm va formulado en LNP compuestas típicamente por lípido ionizable, colesterol, fosfolípido ayudante (p. ej., DSPC) y PEG-lípido; esta matriz protege el ARNm, favorece su endocitosis y el escape endosomal; suele administrarse por inyección (E) intramuscular o intradérmica. C) ADN plasmídico (o ADN minicircular, no viral): codifica el/los antígeno(s) y puede entregarse por inyección (E) y, para aumentar captación/expresión, mediante electroporación (D) o biobalística/gene gun (F). D) Electroporación: pulsos eléctricos transitorios que aumentan la permeabilidad de membrana y la entrada de ADN/ARN. E) Inyección: administración intradérmica/intramuscular (y en algunos enfoques, intratumoral). F) Gene gun (biobalística): microproyectiles recubiertos de ADN acelerados hacia la epidermis para transfección local. Combinaciones típicas: ADN plasmídico + electroporación (D) o gene gun (F); ARNm en LNP + inyección (E); adenovirus + inyección (E). El panel A representa vehículo viral de ADN, mientras que el panel C corresponde a ADN no viral; son categorías complementarias. Ilustraciones no a escala y con fines esquemáticos; la figura no implica comparaciones de eficacia.

1.4 Vía CD40–CD40L: generalidades y estrategias terapéuticas en VPH

CD40 es un receptor coestimulador de la familia TNF, expresado principalmente en células presentadoras de antígeno (APC) como células dendríticas, macrófagos, monocitos y linfocitos B, y en menor medida en algunas células epiteliales, mientras que su ligando CD40L (CD154) se expresa de forma transitoria en linfocitos T activados y en plaquetas y otras células bajo condiciones inflamatorias [68, 77, 78] (**Figura 9**). La interacción CD40–CD40L es esencial para la regulación de la respuesta inmune adaptativa y para la activación de la inmunidad innata.

En linfocitos B, la señalización vía CD40 promueve la activación, proliferación, cambio de clase de inmunoglobulina y generación de memoria, procesos dependientes de la interacción con CD40L en linfocitos T cooperadores [68, 77]. En APCs, la activación de CD40 induce maduración, aumento de moléculas coestimuladoras (como B7), producción de citocinas proinflamatorias (IL-12, TNF- α) y mejora la presentación antigénica, incrementando la activación de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ [78–82].

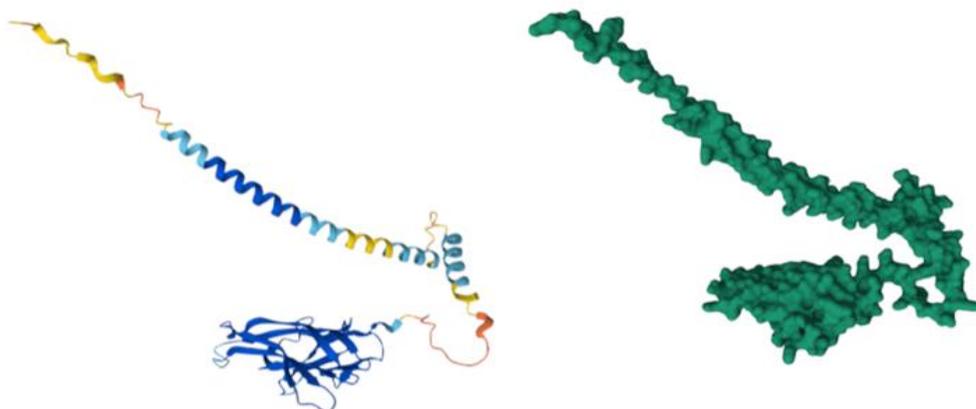


Figura 9. Modelo de CD40L predicho por AlphaFold. A la izquierda, representación en cintas del ligando de CD40 humano (CD40L/CD154) mostrando un monómero del ectodominio (coloreado según el esquema por defecto del visor). A la derecha, superficie accesible al disolvente del mismo modelo, que resalta su arquitectura alargada. Nótese que CD40L funciona fisiológicamente como homotrímero; el ensamblaje oligomérico no se representa aquí. Fuente del modelo: AlphaFold Protein Structure Database (AlphaFold).

En el contexto tumoral, la activación de CD40 mediante agonistas (anticuerpos monoclonales, CD40L recombinante o vectores virales) potencia la inmunidad antitumoral a través de: 1) “licenciamiento” de células dendríticas para presentación cruzada de antígenos tumorales, 2) polarización de macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio que favorece la infiltración de células efectoras, y 3) activación de linfocitos B para generar anticuerpos antitumorales [78–82].

Las estrategias de vacunación contra VPH han buscado aprovechar este mecanismo. La fusión de E7 (o E6/E7) a anticuerpos o ligandos dirigidos a CD40 mejora la entrega del antígeno a APCs, promueve su maduración y genera respuestas CD8⁺ específicas, duraderas y con infiltración tumoral, asociadas a regresión tumoral en modelos preclínicos y estudios ex vivo [83]. En un modelo murino, la administración subcutánea de un vector adenoviral codificante para E7 fusionado a CD40L generó inmunorresistencia mediada por linfocitos CD8⁺ frente a tumores E7-positivos durante 1 año, lo que en términos humanos equivaldría a varias décadas de protección [84]. Este efecto podría explicarse porque la activación de CD40 favorece la generación de linfocitos T CD8⁺ de memoria con fenotipo “stem-like”, asociados al control tumoral prolongado [85]. Así mismo, CD40L fue capaz de revertir la anergia a un antígeno propio (MUC-1), lo que refuerza la idea de que CD40L puede romper tolerancia y desencadenar respuestas incluso contra antígenos de baja inmunogenicidad [84].

En ensayos preclínicos y clínicos, los agonistas de CD40 han mostrado mayor eficacia cuando se combinan con inhibidores de puntos de control inmunológico (anti-PD-1, anti-CTLA-4) o con quimioterapia, transformando tumores “fríos” en “calientes” y actuando incluso como “vacunas *in situ*” cuando la quimioterapia induce liberación de antígenos tumorales [79–82, 86]. Sin embargo, la administración de agonistas de CD40 en monoterapia

rara vez produce efectos significativos, lo que apunta a la necesidad de señales adicionales, entre ellas la presentación simultánea de antígeno tumoral.

Este principio se ejemplifica en el estudio de Vogt *et al.*, en el que se administró un vector adenoviral con el antígeno tumoral alfa-fetoproteína por vía subcutánea y, de forma independiente, un adenovirus con CD40L por vía intratumoral. La combinación mejoró significativamente la supervivencia en un modelo murino de carcinoma hepatocelular, en comparación con el uso de CD40L solo, incluso cuando los vectores se administraron en diferentes sitios anatómicos, lo que evidencia el papel adyuvante del antígeno tumoral [87].

De forma complementaria, Morrison *et al.* demostraron que la combinación de α CD40 con bloqueo de puntos de control (ICB) induce respuestas duraderas de linfocitos T, un efecto no alcanzable con ICB en monoterapia y que fue independiente de las vías TLR, STING o IFNAR. Esta eficacia requirió tanto la presencia de células dendríticas (DCs) como la expresión de CD40 en el huésped [86].

Este concepto de sinergia entre señales coestimuladoras se ha confirmado también *in vitro*. Feng *et al.* desarrollaron una proteína de fusión que contenía el dominio extra A (EDA) de fibronectina (ligando natural de TLR4) unido a E7 de VPH, la cual fue capturada eficientemente por DC derivadas de PBMC humanas, induciendo su maduración y promoviendo respuestas de CTL específicas contra células que expresaban E7; este efecto se potenció al combinarse con agonistas de CD40 y otros ligandos de TLR (poly(I:C), R848, CpG2216) [88]. De forma concordante *in vivo*, la coinyección de E7 recombinante con oligonucleótidos CpG (CpG ODN) activó linfocitos CD4⁺ y, de manera predominante, CD8⁺, reduciendo significativamente la formación tumoral en el modelo singénico TC-1 [89, 90]. De manera análoga, Yin *et al.* demostraron *in vivo* que la administración conjunta de una

vacuna dirigida a CD40 (anticuerpo α CD40 fusionado a E6/E7) con poly(I:C) inducía potentes respuestas de CD8⁺ infiltrantes en tumores VPH-16⁺, asociadas con control tumoral duradero [83].

Finalmente, más allá del escenario de las vacunas, en tumores VPH⁺ de cabeza y cuello, un agonista de CD40 dirigido a FAP (fibroblast activation protein- α , expresada por fibroblastos asociados a cáncer del estroma tumoral) sinergizó con radioterapia hipofraccionada, logrando respuestas completas duraderas y memoria antitumoral en modelos murinos, mientras que el agonista solo tuvo efecto transitorio [91]; este enfoque ilustra que direccionar CD40 al microambiente y aportar señales de daño/liberación de antígeno (RT) puede reactivar la presentación y la respuesta efectora sin añadir antígeno exógeno.

En conjunto, estos resultados apoyan estrategias multicompetentes, en las que la activación de CD40 se combine con agonistas de TLR, STING o vías de IFN, y, según el contexto, con ICB o radioterapia, para maximizar la inmunogenicidad y contrarrestar los mecanismos de inmunoevasión tumoral. En este sentido, usar CD40 es coherente con la biología del VPH: puede compensar el bloqueo del eje CD40–CD40L si se dirige al compartimento adecuado (DC/estroma) y se acompaña de señales de antígeno/peligro; es decir, no es una intervención suficiente en monoterapia, pero sí un nodo central sobre el cual apilar co-señales no redundantes. En la **Tabla III** se sintetizan los nodos de evasión mediados por E5/E6/E7 y su posible reversión mediante intervenciones basadas en CD40–CD40L y las co-señales empleadas.

Nodo de inmunoevasión (VPH)	Déficit/ mecanismo	Estrategia basada en CD40 que lo contrarresta	Cómo lo revierte (mecanismo/ compartimento)	Co-señales clave	Referencia
APM y MHC-I (E5 dominante)	E5 limita peptidoma (inmuno-proteasoma) y reduce MHC-I funcional	Activación de CD40 en epitelio tumoral o en DC	Induce TAP-1, TAP-2 y tapasin y subunidades del inmunoproteasoma; mejora la vía clásica MHC-I y la lisis por CTL (epitelio) y el “licenciamiento” de DC (ganglio)	Antígeno disponible (vacunación dirigida a CD40 o liberación por RT)	[50–52, 77, 78, 82]
Tráfico/superficie MHC-I (E5)	Retención de HLA-I en RE/Golgi	CD40 en tumor/epitelio	Aumenta maquinaria APM y favorece carga/expresión de MHC-I; sensibiliza a CTL	Puede requerir liberación de antígeno o vacunación	[50–52]
PRR/IFN-I atenuados (E6/E7/E5)	Bloqueo de IRF3/IFN- β (E6), represión TLR9 (E6/E7), interferencia STING/IFN-I e IFN- κ (E5)	Vacunas dirigidas a CD40 con o sin agonistas TLR; α CD40 combinado con ICB	CD40 no es PRR, pero madura APC y suple coestimulación aun con PRR deprimidos; α CD40 + ICB genera respuestas T duraderas independientes de TLR/STING/IFNAR	TLR (poly(I:C), R848, CpG) o ICB según contexto	[80, 82–84]
NF-κB inflamatorio suprimido (E7 en queratinocito)	Menor producción de citocinas y quimioatracción	Ligación CD40–CD154 en epitelio o CD40 exógeno	CD40 restaura quimiocinas en epitelio no transformado; en carcinoma, CD40 suele estar alto y su activación potencia APM/MHC-I	Puede requerir IFN- γ /PRR activos o señales de daño	[46–48, 50]
APC locales disfuncionales (E7)	LC/DC con reducción de IL-12 y migración alterada; microvesículas de E7 disminuyen CD40/IL-12p40	CD40L/ α CD40 para “licenciar” DC y apoyo de CD4 ⁺	Aumenta CD40/CD80 en MoDC en ganglio, potencia IL-12 y la expansión de CD8 ⁺ efector (licenciamiento en ganglio)	IFN- γ ; co-agonistas TLR si PRR están bajos	[27, 53]
Tolerancia/anergia	Respuesta T insuficiente a antígenos propios o poco inmunógenos	CD40L (vector/anticuerpo) con o sin antígeno tumoral	Rompe tolerancia y permite respuesta frente a antígeno propio (p. ej., MUC-1); con E7/E6, la entrega dirigida a CD40 mejora magnitud y calidad de CD8 ⁺	Co-señales TLR o antígeno en formato inmunogénico	[77, 78, 82]
Memoria CD8⁺ insuficiente	Respuestas poco duraderas	CD40 en vacunación terapéutica	Favorece memoria CD8 ⁺ de fenotipo stem-like y control prolongado	Refuerzo con TLR/antígeno	[77, 79, 81]
Estroma/microambiente “Frio”	Escasa liberación de antígeno y barreras estromales	Agonista de CD40 dirigido a FAP combinado con RT	RT libera antígeno y señales de daño; CD40 en estroma activa el eje cDC1–CD8 ⁺ local; control duradero en VPH ⁺ preclínico	RT; posible ICB según escenario	[85]

Tabla III. Mapeo de nodos de inmunoevasión por VPH y puntos de reversión por CD40. La tabla relaciona los principales nodos mecánicos de evasión mediados por las oncoproteínas virales con estrategias basadas en CD40/CD40L (vacunas dirigidas, CD40L recombinante, anticuerpos agonistas y combinaciones).

1.5 Vacunas de ADN en VPH

La terapia génica introduce material genético en el hospedero mediante vectores (p. ej., liposomas, vectores adenovirales) y métodos físicos como biobalística/gene gun o electroporación [55]. En este marco, las vacunas terapéuticas de ADN para el VPH constituyen una estrategia para inducir inmunidad celular específica frente a células infectadas/transformadas que expresan E6/E7 (principalmente de VPH-16/18), a diferencia de las vacunas profilácticas que previenen la infección [58, 59, 61–64, 76]. Además, avances recientes en ARNm-LNP y vectores virales (adenovirus/MVA/AAV) confirman principios convergentes de presentación antigénica y activación T aplicables al contexto del VPH [59, 61–63, 76, 92, 93].

1.5.1 Estado actual de las vacunas de ADN terapéuticas contra el VPH

Para dimensionar la madurez clínica, realizamos una búsqueda exhaustiva en ClinicalTrials.gov (y literatura asociada) combinando términos amplios de condición: cervical intraepithelial neoplasia (CIN/HSIL), anal HSIL/AIN, oropharyngeal/HNSCC, cervical cancer, VPH-16/18; con intervenciones de texto libre: DNA vaccine, DNA immunotherapy, plasmid, y nombres de producto (VGX-3100, INO-3112/MEDI0457, VB10.16, GX-188E, “E7-KDEL”), además de revisar fichas de programa y publicaciones que referencian NCTs. Con este enfoque identificamos ~20 ensayos fase I–III de vacunas de ADN terapéuticas frente a VPH en lesiones intraepiteliales y tumores VPH⁺. La disparidad con búsquedas más estrechas (p. ej., condition: “HPV-Related carcinoma” y intervention: “DNA vaccine”) se explica porque muchos estudios se indexan bajo CIN/HSIL o HNSCC y

describen la intervención como “DNA immunotherapy” o por la marca/plataforma en lugar de “DNA vaccine” u otros términos similares (**Tabla IV**).

1. **Inducción de inmunidad celular específica.** Ensayos preclínicos y clínicos con vectores E6/E7 (p. ej., VGX-3100, GX-188E) muestran respuestas CD8⁺/CD4⁺ específicas, regresión de CIN2/3 y aclaramiento viral, con correlación entre magnitud de IFN- γ y reducción de lesión (En paralelo, plataformas ARNm-LNP y adenovirales muestran patrones similares de activación T y control tumoral en modelos VPH, reforzando el principio biológico subyacente).
2. **Seguridad y tolerabilidad.** Los perfiles clínicos de las vacunas de ADN son favorables, con efectos adversos mayormente locales y sin toxicidades limitantes, adecuados para lesiones precursoras o enfermedad temprana.
3. **Potencial de combinación.** La electroporación o la biobalística mejoran captación y expresión del plásmido; además, combinar ADN con módulos inmunoestimuladores (p. ej., IL-12) o con bloqueo de puntos de control potencia la citotoxicidad y el control tumoral, este patrón de sinergia también se observa en adenovirus, ARNm-LNP con adyuvantes de ácidos nucleicos y/o ICB.
4. **Ventajas logísticas.** El pDNA es escalable, estable y permite codificar múltiples antígenos, facilitando adaptación por genotipo y uso en entornos con infraestructura limitada.
5. **Limitaciones.** La eficacia clínica comparada con abordajes estándar (p. ej., conización) sigue siendo moderada y aún no hay vacunas terapéuticas de ADN aprobadas; las prioridades incluyen mejorar entrega y presentación antigénica, ampliar cobertura y optimizar esquemas [58, 59, 61–64, 76, 93].

Familia / Plataforma	Denomina- ción	Composición	Vía / dispo- sitivo	Indicación (población)	Fase	Registro (NCT) (Ref)
<i>Inovio – familia VGX (ADN plasmídico)</i>	VGX-3100	Vectores E6/E7 (VPH-16/18)	IM + electro- poración	HSIL cervical (CIN2/3)	II	NCT 01304524 [94]
	VGX-3100 (REVEAL-2)	Vectores E6/E7 (VPH-16/18)	IM + electro- poración	HSIL cervical (CIN2/3)	III	NCT 03721978 [95]
	VGX-3100	Vectores E6/E7 (VPH-16/18)	IM + electro- poración	HSIL anal	Abierto / explora- torio	NCT 03499795 [96]
	VGX-3100 (AMC-103)	Vectores E6/E7 (VPH-16/18)	IM + electro- poración	HSIL anal	II	NCT 03603808 [97]
<i>Inovio – familia VGX (extensión con adyuvante genético)</i>	MEDI0457 / INO-3112	VGX-3100 + INO-9012 (IL-12)	IM + electro- poración	Cáncer de cabeza/ cuello VPH+; cérvix (selecciona- dos)	I/IIa	NCT 02163057 [98]
	MEDI0457 + pembro- lizumab	VGX-3100 + IL- 12 (ADN) + ICI	IM + electro- poración	Cánceres VPH- asociados	2a	NCT 03439085 [99]
	MEDI0457 + durva-lumab	VGX-3100 + IL- 12 (ADN) + ICI	IM + electro- poración	HNSCC R/M VPH- asociado	1b/2a	NCT 03162224 [100]
<i>Genexine – GX- 188E (ADN plasmídico)</i>	GX-188E	Plásmido E6/E7 optimizado	ID/IM (según protocol o)	CIN3	IIb	NCT 02139267 [101]
	GX-188E	Plásmido E6/E7 optimizado	ID/IM	CIN3 (mujeres)	IIb	NCT 02411019 [102]
	GX-188E + pembrolizum ab	ADN + ICI	IM/ID (± tópicos)	Cáncer avanzado VPH- relacionado	Ib/II	NCT 03444376 [103]
	GX-188E ± GX- I7/imiquimod	ADN (± citoquina/ agonistas)	Varios (incl. tópico)	CIN3	II	NCT 03206138 [104]

	GX-188E (dose-finding)	Plásmido E6/E7	ID/IM	CIN3	I/II	NCT 01634503 [105]
<i>Nykode/Vaccibody – VB10.16 (ADN dirigido a APC)</i>	VB10.16 (FIH)	Plásmido con direccionamiento a APC (E6/E7 VPH-16)	IM	Cáncer cervical VPH-16 ⁺	I/II	NCT 02529930 [106]
	VB10.16 + pembrolizumab (KEYNOTE-A05)	ADN + ICI	IM	HNSCC R/M VPH-16 ⁺	II	NCT 06016920 [107]
	VB10.16 (avanzado)	ADN dirigido a APC	IM	Cáncer cervical avanzado	II	NCT 06099418 [108]
	VB10.16 (VIN)	ADN dirigido a APC	IM	Neoplasia intraepitelial vulvar (VIN)	II	NCT 04405349 [109]
<i>pNGVL (constructos académicos de ADN plasmídico)</i>	pNGVL4a-CRT/E7 (detox)	E7 detox fusionado a calreticulina	ID/IM (según sitio)	HNSCC VPH-16 ⁺ ; piloto en CIN2/3	I	NCT 01493154 [110]
	pNGVL4a-CRTE6E7L2	Constructo multiepitópico (E6/E7/L2)	ID/IM	HNSCC VPH ⁺	I	NCT 04131413 [111]
Otros ADN históricos	Amo-limogene (ZYC101a)	Plásmido ADN encapsulado en micro-partículas	IM	HSIL/CIN2/3	III	NCT 00264732 [112]

Tabla IV. Ensayos clínicos de vacunas terapéuticas de ADN contra VPH. Se listan candidato, composición (antígeno/adjuvantes), vía/dispositivo de administración, indicación, fase y el registro ClinicalTrials.gov (NCT). La familia VGX incluye MEDI0457/INO-3112 como extensión de VGX-3100 con IL-12 plasmídica (INO-9012), administrada por electroporación. Las entradas VB10.16 corresponden a un vector de ADN con direccionamiento a APC; GX-188E es un plásmido E6/E7 optimizado; pNGVL agrupa constructos académicos (p. ej., CRT/E7).

1.5.2 Fundamento inmunológico y optimización del diseño

Para que un linfocito T reconozca su diana, el antígeno debe degradarse en el citosol; los péptidos generados se transportan al retículo endoplásmico por el transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP), donde, con chaperonas, se cargan en MHC-I y se expresan en la superficie (

Figura 10). Este flujo es intrínsecamente ineficiente (≈ 1 péptido presentado por cada 10,000 proteínas degradadas) [113]. Por ello, se han desarrollado diseños que incrementan la visibilidad antigénica; entre ellos, redirigir el antígeno al RE mediante fusión con proteínas residentes como calreticulina, para favorecer el ensamblaje MHC-I y potenciar la activación T [114].

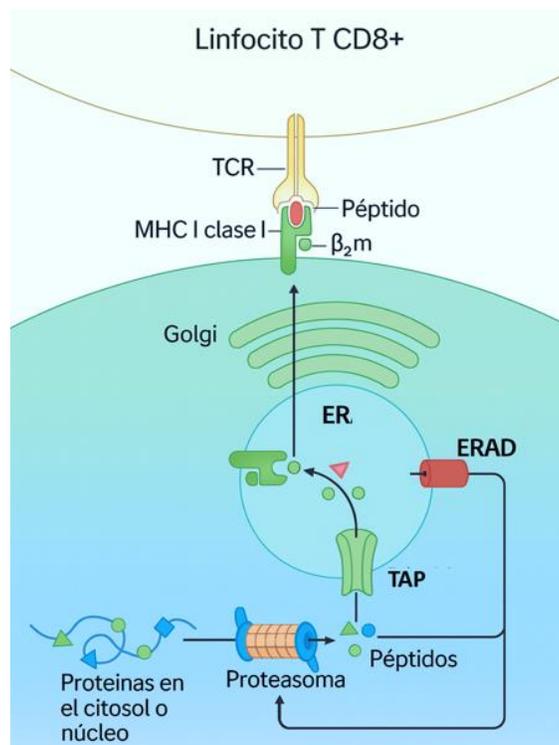


Figura 10. Presentación de antígenos por MHC I. En este esquema se representa el proceso de presentación de antígenos a partir de proteínas endógenas por medio de moléculas de MHC I. Para que este proceso se lleve a cabo se deben de generar pequeños péptidos que deberán translocarse a la luz del RE, donde serán montados en las moléculas de MHC I con ayuda de diversas chaperonas. Adaptación [115].

1.6 Proteostasis del retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo esencial en la biología celular, encargado no solo de la síntesis, el plegamiento y la maduración de proteínas, sino también de la regulación lipídica y el almacenamiento de calcio intracelular [116–118]. Las proteínas secretoras y de membrana son translocadas cotraduccionalmente desde el ribosoma al lumen del RE a través del complejo translocón Sec61, o insertadas en su membrana [119, 120]. Una vez en el lumen, el proceso de plegamiento es asistido por chaperonas como BiP/GRP78, calnexina y calreticulina, mientras que enzimas como las proteínas disulfuro isomerasas (PDI) facilitan la formación de enlaces disulfuro [116–124].

1.6.1 Control de calidad en retículo endoplásmico

El control de calidad del RE (ERQC), altamente conservado, monitorea el estado de plegamiento mediante sensores de conformación y modificaciones de N-glicanos, reteniendo proteínas inmaduras y permitiendo ciclos adicionales de plegamiento [119, 120]. Aquellas que no alcanzan la conformación nativa son eliminadas principalmente a través de la degradación asociada al RE (ERAD), que implica retrotranslocación al citosol por canales que pueden incluir Sec61, ubiquitinación y degradación proteasomal [119, 121, 123, 124].

Además, ciertas proteínas pueden ser eliminadas mediante ER-fagia, un proceso selectivo que, a diferencia de la ERAD que actúa sobre proteínas específicas, elimina dominios o fragmentos completos del retículo endoplásmico. La ER-fagia incluye tres mecanismos principales: la macro-ER-fagia, en la que fragmentos del RE son englobados por autofagosomas; la micro-ER-fagia, donde subdominios del RE son directamente ingeridos por lisosomas; y la vía de transporte vesicular, en la que vesículas derivadas del RE se

fusionan con lisosomas. En conjunto, estos procesos se engloban dentro de la degradación asociada al RE-lisosoma (ERLAD) [121, 124].

1.6.2 Respuesta a proteínas mal plegadas

Cuando la cantidad de proteínas mal plegadas o no plegadas sobrepasa la capacidad del RE, se desencadena un estado de estrés del RE, lo que activa una respuesta adaptativa conocida como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) [116–118, 122–128]. Esta respuesta está mediada por tres sensores transmembrana: IRE1, PERK y ATF6 [117, 123–126, 128] que detectan el desbalance en la homeostasis proteica e inducen diversos mecanismos compensatorios:

1. **Disminución de la traducción global:** PERK fosforila eIF2 α , lo que reduce temporalmente la síntesis de proteínas y limita la entrada de nuevas cadenas al RE, dando tiempo al sistema de plegamiento y degradación para estabilizarse [123, 126, 128, 129].
2. **Aumento de chaperonas y enzimas de plegamiento:** La UPR incrementa la producción de chaperonas como GRP78/BiP, calnexina, calreticulina y PDIs, que facilitan el correcto plegamiento y previenen la acumulación de agregados proteicos [120, 121, 123, 124, 127].
3. **Refuerzo de la degradación proteica:** Se potencia la vía ERAD, encargada de reconocer y retrotranslocar proteínas defectuosas hacia el proteasoma, reduciendo así la carga proteotóxica [116, 123, 124, 127].

No obstante, si estas medidas no logran restablecer la homeostasis, la UPR puede cambiar de un perfil protector a uno proapoptótico. En este escenario, los sensores IRE1 y PERK activan cascadas que inducen factores como CHOP y promueven la activación de caspasas, llevando finalmente a la muerte celular programada [118, 123, 126–128].

1.6.3 Degradación asociada a retículo endoplásmico

La degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) elimina selectivamente proteínas aberrantes clasificando los sustratos según la localización del defecto de plegamiento u organización estructural: luminal (ERAD-L), transmembrana (ERAD-M) o citosólica (ERAD-C) [130–137]. En el lumen, lectinas y chaperonas del control de calidad (ERQC), como OS-9 y XTP3-B en mamíferos, o Yos9p en levaduras, reconocen firmas de mal plegamiento (incluida la desmanosilación progresiva de N-glicanos) y entregan los sustratos al eje HRD1/SEL1L/Derlin para su retrotranslocación, poliubiquitinación y degradación proteasomal (ERAD-L) [130, 131, 133–136]. Cuando el defecto reside en segmentos intramembrana, la vigilancia recae en ERAD-M, donde HRD1 y gp78 (mamíferos) o Hrd1p (levaduras) detectan “degrones” transmembrana; en levaduras, Doa10 puede solaparse con este espectro, ampliando la frontera entre ERAD-M y ERAD-C [131, 132, 134, 135, 137]. Por su parte, ERAD-C atiende lesiones expuestas en dominios citosólicos de proteínas de membrana, con Doa10 como E3 prototípica en levaduras y una mayor redundancia de E3 en mamíferos (incluida gp78), lo que hace que la tripartición L/M/C sea menos rígida en células de mamífero que en levaduras [131, 132, 134, 135]. En todos los casos, la extracción al citosol converge en ATPasas tipo Cdc48p (levaduras) o p97/VCP (mamíferos), con cofactores Ufd1/Npl4, que despachan el sustrato al proteasoma 26S; la dependencia de

cofactores puede variar con la E3 implicada (p. ej., Ufd1 es crítico para HRD1 y menos necesario para gp78) [131, 134, 135, 137].

1.6.4 Papel de las disulfuro isomerasas en el control de calidad del RE

En el RE, el plegamiento oxidativo depende de oxidorreductasas residentes. PDI cataliza la formación, ruptura e isomerización de puentes disulfuro y, en su estado reducido, puede actuar como reductasa/unfoldasa, preparando sustratos para la retrotranslocación y degradación por el proteasoma 26S [138–140]. Estos roles complementan observaciones funcionales previas: la maquinaria ERAD se ralentiza frente a dominios muy compactos o agregados con disulfuros intermoleculares (p. ej., un dominio *tightly folded* fusionado a CPY dificulta su degradación) [141]; la exportación retrógrada suele requerir monómeros desplegados, como se infiere de TCR α no ensamblada (dos residuos básicos evitan la oligomerización por disulfuros y favorecen el recambio) [142] y de la κ -light chain no secretada, que se reduce a monómero antes de exportarse [143]. Coherentemente, PDI puede romper disulfuros en sustratos oligomerizados y se asocia a complejos de retrotranslocación en la membrana del RE [144, 145].

ERdj5, miembro especializado de la familia PDI, acelera la degradación de sustratos mal plegados al reducir disulfuros no nativos y coordinarse con EDEM1 (que reconoce glicanos recortados) y BiP, facilitando la entrega del sustrato al canal de retrotranslocación [146–149]. Además de su rol degradativo, ERdj5 contribuye al plegamiento productivo de ciertas proteínas (p. ej., receptor de LDL) al eliminar puentes disulfuro erróneos durante la maduración [149], lo que encaja con el modelo en que desreducción y edición de N-glicanos (vía EDEM) convergen para decidir “re-plegar o degradar” [150].

1.6.5 Retrotranslocación de proteínas del RE al proteasoma

Aunque Sec61 se propuso como canal de retrotranslocación, su papel parece no mayoritario: muchos sustratos ERAD se degradan sin Sec61 funcional [151–154], pese a que existen datos que lo implican en algunos casos [155–157]. En su lugar, la evidencia apoya múltiples rutas redundantes y especializadas: complejos HRD1-like (núcleo E3 ligasa), Derlin-1/VIMP (SELS) y el ATPasa p97/VCP (con Ufd1/Npl4) formarían supracomplejos con EDEM1, ERdj5 y BiP que reconocen, ubiquitinan, extraen y entregan sustratos al proteasoma [146–149, 158]. En conjunto, estos datos sostienen un modelo modular donde el estado redox, la firma de N-glicanos y la topología del degrón determinan qué ruta de salida (HRD1/Derlin/p97 \pm participación de Sec61) se activa para cada sustrato.

1.6.6 Presentación de antígenos por MHC-I

La presentación de antígenos por MHC de clase I (MHC-I) comienza cuando las proteínas endógenas son ubiquitinadas y fragmentadas por el inmunoproteasoma en péptidos de 8–11 aminoácidos. El interferón- γ regula al alza las subunidades del inmunoproteasoma (por ejemplo, LMP2, LMP7), ampliando el repertorio peptídico y favoreciendo los ligandos de MHC-I [138, 139, 159]. El inmunoproteasoma es una variante del proteasoma que se ensambla en presencia de citocinas inflamatorias, principalmente IFN- γ , y cuya función es optimizar la generación de péptidos para la presentación por MHC-I, especialmente en células presentadoras de antígenos. Los péptidos resultantes son transportados al RE por TAP1/TAP2, componentes centrales del complejo de carga de péptidos (PLC) [138, 139, 147, 148, 150, 160–163]. Dentro del RE, los péptidos pueden ser recortados a la longitud óptima por ERAP1/ERAP2 [148, 150, 161–163].

El ensamblaje y edición de MHC-I están regulados por chaperonas del RE: la cadena pesada se pliega con calnexina, se asocia con β 2-microglobulina y luego interactúa con calreticulina y ERp57 para estabilizar una conformación receptiva al péptido. Tapasina conecta MHC-I con TAP y cataliza la edición de péptidos, favoreciendo ligandos de alta afinidad y complejos péptido:MHC-I estables. ERp57 forma un heterodímero unido por disulfuro con tapasina para respaldar el control de calidad [148, 150, 160–165]. Una vez cargado de manera óptima, el complejo péptido:MHC-I abandona el PLC y transita por el Golgi hacia la superficie celular para la vigilancia de linfocitos T CD8⁺ [138, 139, 148, 150, 160, 161, 164–166].

En la presentación cruzada, los antígenos exógenos ingresan por rutas endocíticas, son exportados al citosol para su procesamiento proteosómico, y sus péptidos son transportados por TAP al RE (o cargados en endosomas) usando la misma maquinaria del PLC [148, 167]. Los interferones tipo I/II (IFN- α/β , IFN- γ) aumentan la transcripción de genes de MHC-I y de procesamiento de antígenos a través de elementos promotores conservados, potenciando la presentación en superficie [138, 139, 147].

De manera crucial, la proteostasis del RE y la degradación asociada al RE (ERAD) se intersectan con esta vía: el control de calidad del RE (ERQC) y la ERAD generan un suministro de péptidos al dirigir proteínas mal plegadas o retenidas en el RE hacia dislocación, ubiquitinación y procesamiento proteosómico, alimentando así la ruta de MHC-I. Dirigir los antígenos al RE incrementa su exposición a ERQC/ERAD y al PLC, lo que puede aumentar la disponibilidad de péptidos y la eficiencia de carga bajo condiciones que mantienen la homeostasis del RE.

1.6.7 Implicaciones para direccionar antígenos al RE

En este marco, los resultados de Martínez *et al.* con construcciones que dirigen E7 al RE permiten mapear de forma funcional cómo la topología del sustrato condiciona la vía degradativa en sistemas de mamífero [168]. Las variantes sin dominio de anclaje de membrana (MBD), por ejemplo, SP-E7-ERAD-K y SP-E7-ERAD-S, mostraron acumulación al inhibir el proteasoma con MG132, lo que es coherente con un turnover proteasoma-dependiente típico de ERAD-L/ERAD-C: el antígeno, retenido luminalmente o con porción citosólica accesible, es reconocido por ERQC, retrotranslocado vía HRD1/Derlin y eliminado por p97/proteasoma [130, 131, 133–136]. En contraste, las variantes con un dominio de unión a membrana, COX2-E7 y SP-MBD-E7-ERAD-K, no se vieron afectadas por MG132, sugiriendo que su eliminación no depende mayoritariamente del proteasoma en esas condiciones. Esta resistencia es compatible con varias posibilidades no excluyentes: (i) un desvío parcial hacia ERAD-M con participación de gp78/Derlin y requisitos de cofactores distintos. (ii) una estabilización topológica que reduce la tasa de retrotranslocación; y/o (iii) el uso relativo de vías lisosomales selectivas del RE (ER-fagia/ERLAD) cuando el sustrato es intrínsecamente más “membranoso” o menos apto para pasar como monómero desplegado por el poro de retrotranslocación [131, 132, 134, 135, 137, 168].

En conjunto, estos datos apoyan dos conclusiones importantes. Primero, la clasificación ERAD-L/M/C es operativa en mamíferos, pero presenta solapamiento funcional entre E3 y rutas, de modo que la topología y el contexto de plegamiento del antígeno determinan si predomina el eje p97/proteasoma o si aumenta la contribución de ER-fagia/ERLAD [130–137, 169]. Segundo, en diseños que redirigen antígenos al RE, la presencia o ausencia de un MBD no solo modula la eficiencia de presentación, sino también la vía degradativa

predominante, lo que explica por qué constructos sin MBD son sensibles a MG132 (flujo ERAD-L/C) y constructos con MBD pueden escapar a esa sensibilidad (peso relativo de ERAD-M/ERLAD) [168] (**Tabla V**). Esta lectura armoniza el comportamiento experimental de las variantes de E7 con el modelo mecánico de ERAD y sus diferencias entre levaduras y mamíferos [130–137].

Aspecto	ERAD-L	ERAD-M	ERAD-C
Localización del defecto	Lumen del RE	Segmento(s) transmembrana	Dominio citosólico
Reconocimiento / E3 predominante	Lectinas/chaperonas lumbinales (OS-9, XTP3-B; Yos9p en levaduras). Complejo HRD1/SEL1L (Hrd1p/Hrd3p en levaduras).	HRD1 y/o gp78 (solapamiento funcional). En levaduras, Hrd1p; Doa10 puede cruzar espectros.	Doa10 (levaduras) para degrones citosólicos; en mamíferos hay redundancia (p. ej., gp78).
Complejo de retrotranslocación	Núcleo HRD1-like con SEL1L/Derlin.	HRD1-like y/o Derlin; topología condiciona acceso al poro.	Complejos citosólicos acoplados a E3 que reconocen degrones expuestos.
Extracción y destino	p97/VCP-Ufd1-Npl4; proteasoma 26S.	p97/VCP-Ufd1-Npl4; proteasoma 26S. Parte del flujo puede desviarse a ER-fagia/ERLAD si el sustrato es poco “retrotranslocable”.	p97/VCP-Ufd1-Npl4; proteasoma 26S.
Respuesta típica a MG132	Acumulación frecuente (bloqueo de proteasoma).	Variable: sensible si retrotransloca eficazmente; menos sensible si predomina una ruta lisosomal (ER-fagia/ERLAD).	Acumulación frecuente (bloqueo proteasoma).
Implicaciones generales (diseño de antígenos)	Sustratos lumbinales favorecen flujo proteasoma-dependiente y pueden aumentar la generación de péptidos para MHC-I.	Sustratos con anclaje de membrana pueden requerir afinamiento topológico; riesgo relativo de desvío a ER-fagia/ERLAD si no retrotranslocan como monómeros.	Degrones citosólicos bien expuestos suelen alimentar eficientemente el proteasoma; potencial alto para carga de MHC-I.

Tabla V. Vías ERAD y su relevancia para antígenos dirigidos al RE. Se comparan las tres rutas de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) según la localización del degrón (ERAD-L: luminal; ERAD-M: transmembrana; ERAD-C: citosólica), los módulos de control de calidad (ERQC) que los reconocen, las E3 ligasas predominantes en levaduras y mamíferos, los complejos de retrotranslocación y el motor de extracción (p97/VCP/Cdc48), así como el destino degradativo (proteasoma 26S y, para sustratos voluminosos/oligomerizados, posible desvío a ER-fagia/ERLAD). La columna de “Sensibilidad a MG132” resume el patrón esperado cuando el proteasoma se inhibe, en el estudio de Martínez *et al.* [168], los constructos sin dominio de unión a membrana aumentaron con MG132 (compatible con ERAD-L/C), mientras que los que contenían dicho dominio no cambiaron (compatible con predominio ERAD-M/ERLAD). “Implicaciones generales” sintetiza consecuencias prácticas para el diseño de antígenos redirigidos al RE (flujo de péptidos para MHC-I, propensión a activar UPR, partición proteasoma vs ERLAD). Nótese que la separación L/M/C es más estricta en levaduras; en mamíferos existe solapamiento funcional entre E3 y cofactores [130–137].

El control de calidad en el RE combina la detección de parches hidrofóbicos expuestos con un temporizador glucídico basado en N-glicanos. La N-glicosilación en Asn-X-Ser/Thr genera $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, procesado por glucosidasas I/II; la monoglicosilación permite ciclos de interacción con calnexina/calreticulina, que facilitan plegamiento, previenen agregación y reclutan cofactores como ERp57 y peptidil-prolil isomerasas. Si tras la liberación por glucosidasa II el pliegue no es nativo, UGGT reconoce regiones no nativas y reglucosila el N-glicano, reiniciando el ciclo. Este bucle de deglucosilación/reglucosilación actúa como temporizador que otorga múltiples oportunidades de plegamiento antes de derivar a degradación [170–176]. En paralelo, BiP/GRP78 puede reconocer segmentos hidrofóbicos expuestos y, acoplado a Sec61, participar en la importación; esta zona de solapamiento entre biogénesis y control de calidad ayuda a explicar el cambio de función de chaperonas cuando el *tiempo de residencia* supera un umbral [177].

Cuando persiste el mal plegamiento, se activa ERAD: EDEM/Htm1p recortan manosas, generando especies truncadas con α 1,6-manosa terminal [178–183], que son reconocidas por OS9/Yos9p, junto con rasgos de no-plegamiento [175, 184–187]. Además del “si/no” de tener N-glicanos, importa cuántos y dónde: una mayor densidad y proximidad de N-glicanos al degrón acelera el reconocimiento y entrega al ERAD, mientras que N-glicanos escasos o distantes retardan el proceso [188, 189].

1.6.8 Estrategias de direccionamiento al RE para potenciar respuestas CD8⁺

Diversas vacunas con antígenos de VPH han explotado el direccionamiento al retículo endoplásmico (RE) para aumentar el procesamiento por ERQC/ERAD y la carga en MHC-I. En la literatura preclínica sobre VPH se han reportado varias estrategias de direccionamiento

al RE, siendo dos las principales: (i) fusionarlo a calreticulina (CRT); y (ii) enviar el antígeno al lumen del RE mediante la adición de un péptido señal (PS) y una secuencia KDEL para retenerlo en este organelo.

En el caso de la fusión con calreticulina, se han obtenido excelentes resultados en estudios preclínicos (**Tabla VI**). Incluso, se ha avanzado hasta ensayos clínicos obteniendo muy buenos resultados en fase I/II en HSIL/CIN2-3, reportando incluso regresión en casi un tercio de los casos [190].

Construcción / diseño	Conclusión principal	Referencia
CRT-E7 (fusión)	Primera demostración <i>in vivo</i> de que CRT-E7 induce CTL E7-específicos potentes y efecto antiangiogénico; establece el estándar de referencia.	[191]
CRT-E6	Extiende la plataforma a E6: genera CTL E6-específicos y actividad terapéutica, no restringida a E7.	[63]
Comparación de vacunas ADN CRT-E7, LAMP1-E7, HSP70-E7, dII-ETA-E7	CRT-E7 fue la más potente: mayor CD8 ⁺ E7-específica, protección/terapia duraderas y control de tumores con MHC-I reducido; posiciona CRT-E7 como candidato clínico preferente.	[192]
Vac-CRT/E7 (vaccinia recombinante expresando calreticulina fusionada a E7 de VPH-16)	Vac-CRT/E7 generó el mayor número de CD8 ⁺ T IFN- γ + específicos contra E7 en comparación con Vac-E7 o Vac-CRT; indujo potente efecto antitumoral en modelo TC-1, estableciendo vaccinia+CRT como estrategia altamente inmunogénica.	[193]
Variantes por dominios de CRT-E7	Mapea qué dominios de CRT impulsan la potencia inmunitaria y el componente antiangiogénico; guía de optimización del constructo.	[194]
Combinación CRT-E6 + CRT-E7	Vacunar con E6 y E7 en CRT mejora el control tumoral frente a un solo antígeno; apoya diseños multiantígeno.	[195]
Vacuna ADN CRT/E7 en modelo de inmunosupresión inducida por morfina	La vacunación con CRT/E7 revirtió la inmunosupresión causada por morfina, restauró la proliferación de CD8 ⁺ específicos y redujo el crecimiento tumoral.	[196]
Adenovirus defectivo que expresa la proteína de fusión CRT-E7 (Ad-CRT/E7) vs. Ad-E7	La vacunación con Ad-CRT/E7 induce proliferación de linfocitos T, secreción de IFN- γ y fuerte citotoxicidad E7-específica; previene crecimiento tumoral y erradica tumores establecidos con memoria inmunológica duradera.	[197]
Vacuna de ADN hCRTE6E7L2 (CRT fusionada a E6/E7 y al antígeno de cápside L2 de VPH-16)	Indujo simultáneamente inmunidad celular (CD8 ⁺ anti-E6/E7 con efecto terapéutico contra tumores establecidos) y humoral (anticuerpos neutralizantes anti-L2 que protegen frente a infección por	[198]

	pseudoviriones); propuesta como vacuna preventiva y terapéutica	
Vacuna ADN CRT/E7 administrada intradérmica en “cluster regimen” (intervalos cortos, gene gun)	La vacunación en clúster generó rápida inducción de CD8 ⁺ específicos, infiltración tumoral, apoptosis de células tumorales y reducción de Treg y MDSC, con potentes efectos terapéuticos	[199]
Vacuna ADN CRT/E7 combinada con cisplatino en ratones con tumores TC-1	La combinación cisplatino → CRT/E7 generó la mayor respuesta de CD8 ⁺ específicos y los mejores efectos antitumorales y de supervivencia, sugiriendo valor clínico de la quimioinmunoterapia	[200]
CRT-E7 + radioterapia de baja dosis	La radiación de baja dosis actúa como coadyuvante local y amplifica el efecto terapéutico de CRT-E7	[201]
IDLV-CRT/E7	Respuesta T anti-E7 persistente ~1 año tras una dosis; profilaxis y terapia en TC-1 (erradicación de tumores establecidos)	[202]
CRT-E7 + ciclofosfamida (baja dosis)	La modulación sistémica (reducción de Treg) potencia la eficacia antitumoral de CRT-E7	[203]
Vacuna de ADN pNGVL4a-hCRTE6E7L2 (calreticulina fusionada a E6, E7 y L2 de VPH-16), administrada IM + electroporación	Indujo potentes respuestas CD8 ⁺ anti-E6/E7 y efectos antitumorales incluso en ausencia de células CD4 ⁺ T; la respuesta humoral (anti-L2) fue CD4-dependiente. Demuestra eficacia terapéutica en tumores asociados a VPH-16, con potencial en pacientes inmunocomprometidos	[204]
CRT-E7 + GM-CSF local	GM-CSF incrementa DC y la cross-presentación, elevando la inmunidad inducida por CRT-E7	[205]
CRT-E7 + electroporación intravaginal	La vía mucosal con EP induce CD8 ⁺ locales funcionales y control tumoral cervicovaginal; optimiza la entrega de CRT-E7 al sitio diana	[206]
pNGVL4a-CRT/E7(detox) (clínico en CIN2/3)	Señal de traslación clínica: seguridad aceptable y regresiones completas histológicas en una fracción de pacientes	[207]
CRT-E7 (VPH-6/11)	En modelo no tumoral, CRT convierte E7 poco inmunogénico (VPH-6/11) en blanco CTL; identifica epítomos H-2D ^b y HLA-A*0201 y habilita inmunomonitorización	[208]
CRT-E7 + coinyección de IL-2 (intravaginal con electroporación)	IL-2 potencia la respuesta CTL E7-específica y remodela el microambiente (disminuye Treg y MDSC), mejorando el efecto terapéutico de CRT-E7	[209]

Tabla VI. Estudios representativos de estrategias donde fusionan CRT con E6/E7. Estrategias que buscan direccionar antígenos del VPH al RE y así potenciar su presentación por MHC-I/CTL y la respuesta inmune antitumoral o contra la infección por VPH en modelos preclínicos

En estrategias que flanqueando el antígeno E7 con señales de envío y retención en retículo endoplásmico también se ha demostrado de forma consistente una mayor respuesta de linfocitos CD8⁺ específicos al antígeno y un mejor control tumoral (**Tabla VII**).

Plataforma	Diseño (resumen)	Evidencia clave	Lectura / interpretación útil	Referencia
Vacuna de ADN en un vector adenoviral	PS-E7-KDEL	Mayor protección antitumoral al dirigir E7 al RE.	Demuestra por primera vez que PS más KDEL (derivado de CRT) es suficiente para reproducir el beneficio de CRT-E7 en ese contexto experimental.	[114, 210]
Vacuna de ADN	Formatos modulares de: E7SH, FM4, ERP29, H2B, KRT14, CD8 α ; incluyendo PS+KDEL y/o P30-PADRE-NE	Aumento de linfocitos CD8 $^{+}$ y mejor respuesta antitumoral	De todas las proteínas acarreadoras comparadas, solo la del RE (E7SH) tuvo efectividad, y PS-KDEL fueron las señales mínimas.	[211]
Vacuna de ADN	Antígenos de VPH con PS + KDEL	Efecto terapéutico antitumoral potente frente a diseños sin direccionamiento al RE.	Dirigir al RE mejora la eficacia terapéutica respecto a no dirigir.	[212]
Vacuna de ADN	Comparación PS vs PS + KDEL	Añadir KDEL mejora retención en RE y control tumoral frente a solo PS.	PS + KDEL supera a PS, apoyando la lógica de dirigir y retener en RE.	[213]
ADN (análisis mecanístico <i>in vitro</i>)	E6/E7 con PS o PS + KDEL	Aumento de GRP78/BiP y CHOP; activación de ATF4; degradación principal por proteasoma/ERAD y compensación por autofagia cuando se inhibe el proteasoma.	Direccionar al RE activa UPR y deriva a ERAD, coherente con mayor generación de péptidos para MHC-I.	[168]
Vacuna de ADN	PS (de CRT)-SA-E7-4-1BBL	Respuestas profilácticas y terapéuticas muy sólidas, comparables o superiores a CRT-E7 (envío al RE sin módulo co-estimulador).	Estrategia inversa: añadir un co-estimulador a un sistema de envío/retención al RE puede potenciar la eficacia sin perder procesamiento.	[214]
Adenovirus oncolítico	SA-4-1BBL-E7 con PS	El PS dirige al RE y mejora la actividad	La lógica de dirigir al RE también funciona como	[215]

		terapéutica del adenovirus oncolítico respecto a la plataforma sola.	adyuvante de un adenovirus oncolítico con E7.	
Vacuna de ADN	COX2-E7 vs COX2-E7 Δ ERAD	Ambos inducen un efecto antitumoral significativo sin diferencias entre ellos.	Enviar directamente a ERAD no presenta ventajas sobre enviar al RE; la ERAD endógena es suficiente para capitalizar el direccionamiento.	[169]
Vacuna de ADN	Panel ERAD-targeting: PS-E7-ERAD-S (luminal/soluble) vs PS-MBD-E7-ERAD-K y COX2-E7 (con dominio de unión a membrana, MBD)	E7 colocaliza con calnexina; aumento de GRP78 (mRNA e IF); CHOP sin incremento general frente a vacío; variantes con MBD no cambian con MG132; la variante luminal/soluble muestra mejor efecto terapéutico.	El formato luminal/soluble en RE favorece procesamiento y presentación; los anclajes de membrana alteran la vía degradativa y rinden peor terapéuticamente.	[216]

Tabla VII. Estudios con E7 de VPH dirigidos al RE (PS/KDEL). La tabla recopila trabajos preclínicos en los que el antígeno E7 se dirige al lumen del RE mediante péptido señal (PS) con o sin KDEL. Se excluyen, salvo que se indique expresamente, diseños basados en CRT, LAMP-1, BAFF, HSP70/110 u otras rutas no PS/KDEL, así como vacunas peptídicas sin PS/KDEL.

En comparaciones directas, CRT-E7 y E7-PS/KDEL muestran efectos antitumorales similares; sin embargo, la adición de señales coadyuvantes aumenta su eficacia profiláctica y terapéutica, llegando a igualar o incluso superar a estos diseños clásicos. Ello indica que los mecanismos adyuvantes no son redundantes, sino aditivos o sinérgicos, sin comprometer el procesamiento antigénico en el RE. En este sentido, se han explorado estrategias complementarias que abarcan desde señales dirigidas a linfocitos CD4⁺ cooperadores (péptidos universales como P30–PADRE con dominios derivados de Nef), co-estimulación directa (como la multimerización de 4-1BBL tras tránsito por el RE), además de

combinaciones con radioterapia, ciclofosfamida, GM-CSF, electroporación o IL-2. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la noción de que el direccionamiento subcelular al RE y las señales proinflamatorias/co-estimuladoras actúan de manera complementaria en el diseño de vacunas de nueva generación (**Tabla VIII**).

Tipo de adyuvancia / módulo	Plataforma empleada	Lecturas inmunes clave	Hallazgos	Nota respecto a direccionamiento al RE	Referencia
Quimioterapia con cisplatino	ADN (CRT/E7)	Aumento de CD8 ⁺ E7 específicos, intratumoral	La combinación cisplatino+CRT/E7 produjo mejor control tumoral y supervivencia	CRT dirige E7 al RE para favorecer presentación por MHC-I; cisplatino potencia inmunogenicidad tumoral y sinergiza con la vacuna	[200]
Radioterapia de baja dosis peritumoral	ADN (p.ej., CRT/E7 o E7)	Aumento de CD8 ⁺ intratumoral, IFN- γ	Mejora del control tumoral y supervivencia vs vacuna sola	RT favorece liberación de antígeno y reclutamiento de DC; complementa antígenos enviados al RE.	[201]
P30–PADRE–NEF (módulo artificial de epítomos CD4⁺ T-cooperadores)	Formatos modulares (ADN) E7SH y otros, con/sin PS+KDEL y P30–PADRE–NEF;	Aumento de linfocitos CD8 ⁺ y mejor respuesta antitumoral	La adyuvancia de P30–PADRE–NEF potencian las respuestas inmunológicas antitumorales.	Demuestra frente a una comparación de otros acarreadores (FM4, ERP29 vs H2B, KRT14, CD8 α) que la retención en el RE es la condición <i>sine qua non</i> para los efectos anti tumorales.	[211]
Ciclofosfamida a baja dosis (depleción parcial de Treg)	ADN terapéutica anti-VPH	Menor Treg, más CD8 ⁺ específicos, mayor IFN- γ	Aumenta el efecto antitumoral de la vacuna	Condiciona el microambiente; no interfiere con PS/KDEL ni con carga en MHC-I.	[203]
GM-CSF local (acumulación de DC, mejora de cross-presentación)	ADN anti-VPH	Más DC locales y CD8 ⁺ específicos	Incremento de presentación cruzada y respuesta CD8 ⁺	Sinergiza con antígenos dirigidos al RE al elevar las APC.	[205]

Electroporación intravaginal (mejora de entrega)	ADN terapéutica anti-VPH	CD8 ⁺ tisulares, efecto antitumoral local	Respuesta CD8 ⁺ robusta y control de tumores cervicovaginales	Aumenta la transfección sin alterar el tráfico PS/KDEL.	[206]
Co-inyección de IL-2 (ADN)	ADN con electroporación intravaginal	Más CD8 ⁺ E7-específicos, mayor citotoxicidad	Potencia adicional sobre EP sola	Señal 3 que complementa co-estimulación; compatible con envío al RE.	[209]
Co-estimulador 4-1BBL en fusión (SP-SA-E7-4-1BBL)	ADN, gen gun	IFN- γ , control profiláctico y terapéutico	Igual o superior a CRT-E7	Integra co-estimulación manteniendo la lógica de enviar E7 al RE mediante PS.	[214]
Oncolisis + co-estimulación 4-1BBL	Adenovirus oncolítico con OAd::SP-SA-E7-4-1BBL (péptido señal N-terminal de CRT; sin KDEL)	Lisis tumoral selectiva (TC-1), respuesta CD8 ⁺	Mejora la actividad terapéutica del OAd::SP-SA-E7-4-1BBL frente a OAd solo	Dirige el quimérico al RE/vía secretora y potencia el plegamiento de 4-1BBL; el OAd confiere oncolisis selectiva y expresión intratumoral del transgén.	[215]

Tabla VIII. Casos representativos de adyuvancia. La tabla resume estudios donde estrategias adyuvantes (radiación, quimioterapia, citoquinas, co-estimuladores, electroporación, vectores oncolíticos) se acoplan a diseños basados en direccionamiento al RE (p. ej., CRT-E7 o PS/KDEL-E7) para amplificar la inmunogenicidad y el control tumoral.

Martinez-Puente *et al.*, demostraron experimentalmente que llevar E6/E7 al RE (PS con o sin KDEL) activa la respuesta de estrés del RE con aumento de GRP78/BiP y CHOP, y translocación nuclear de ATF4; además, los antígenos se degradan por el proteasoma. En el ensayo con cicloheximida, cuando se bloqueó la síntesis y el proteasoma, los antígenos aún fueron eliminados; y al inhibir el proteasoma se incrementó la autofagia y disminuyó la señal de estrés, indicando que ERAD inicia la eliminación y que la autofagia puede compensar cuando el proteasoma está limitado. Adicionalmente, se demostró que el estrés reticular causado es adaptativo (aumento de GRP78 sin señal apoptótica robusta), lo cual es importante para proporcionar un suministro de antígenos en un plazo suficiente para el

reconocimiento del antígeno E7 por el sistema inmune [168]. Estos datos, definen el itinerario inicial de los antígenos dirigidos al RE y ayuda a entender por qué el direccionamiento favorece la carga en MHC-I, y los mecanismos biológicos detrás (**Figura 11**).

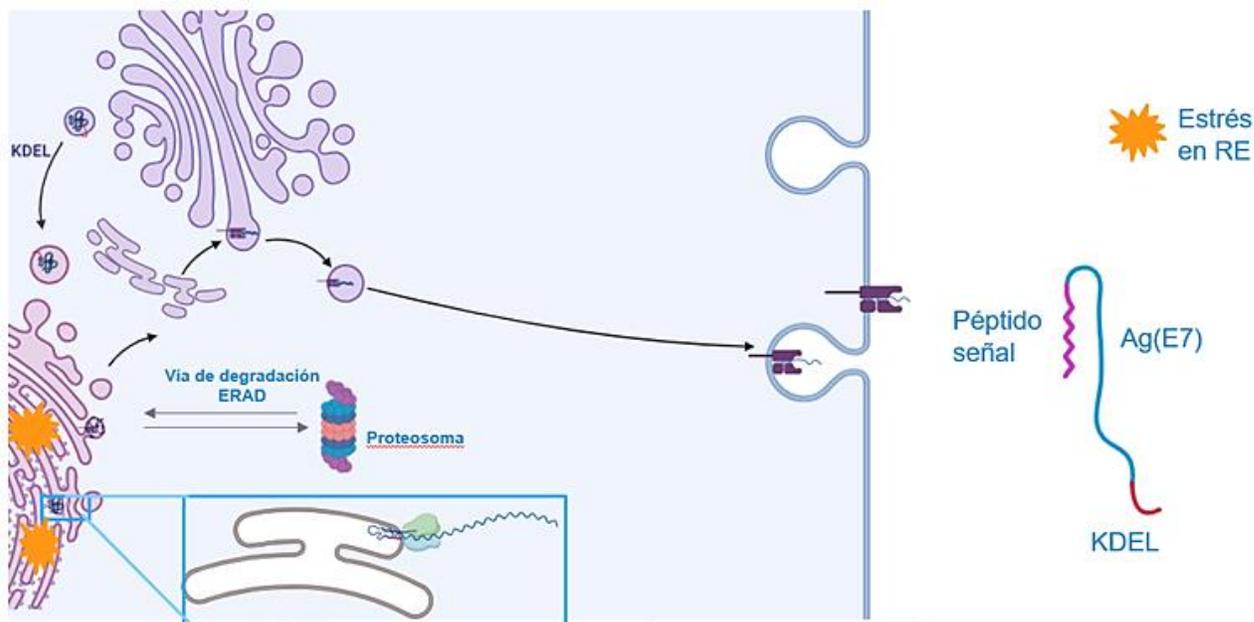


Figura 11. Esquema del direccionamiento de E7 al RE mediante péptido señal y KDEL. La acumulación luminal activa el estrés del RE (aumento de GRP78/BiP y CHOP, con translocación nuclear de ATF4), lo que potencia el control de calidad (ERQC) y la degradación asociada al RE (ERAD). Los antígenos retrotranslocados se ubiquitinan y degradan en el proteasoma. En conjunto, este itinerario explica por qué el envío al RE favorece la generación de péptidos y su carga en MHC-I para presentación a linfocitos T CD8⁺. Esquema inspirado en los hallazgos de Martínez-Puente y cols. [168, 216, 217].

Siguiendo esta lógica se han probado variantes que empujan el antígeno hacia el ERAD desde el propio RE mediante la fusión a COX-2 (proteína residente del RE) o mediante el uso de su cassette de degradación por el ERAD, confirmando su localización en RE y la activación de estrés en retículo endoplásmico (mediante el aumento de GRP78 sin señal apoptótica robusta), coherente con la entrega al eje ERAD-proteasoma [169]. Con lo anterior se observó que enviar directamente al ERAD no supera en eficacia antitumoral a enviar al RE

(PS/KDEL) y permitir su canalización natural hacia la vía ERAD. Posteriormente, un segundo trabajo demostró que cuando el diseño incluye un dominio de unión a membrana (MBD), la degradación puede volverse menos dependiente del proteasoma (insensibilidad a MG132) y los resultados terapéuticos son menos uniformes que con constructos luminales/solubles [216]. En conjunto, los datos favorecen maximizar la residencia luminal en RE y permitir una retrotranslocación eficiente como consecuencia de la respuesta adaptativa de estrés reticular.

Kim *et al.*, compararon, en condiciones controladas con *gene gun* intradérmico, varias estrategias de direccionamiento intracelular del antígeno E7 (LAMP-1/endolisosomal, HSP70/citoplasmática–chaperona, CRT/retículo endoplásmico y dII-ETA/translocación). Todas mejoraron la inmunidad CD8⁺ y el control tumoral frente a TC-1, pero CRT–E7 generó el mayor número de CD8⁺ E7-específicos, con protección y terapia duraderas, además de la capacidad de controlar tumores con niveles de expresión de MHC-I reducidos, un rasgo clínicamente relevante en cánceres VPH-asociados [192]. Estos resultados consolidaron al diseño CRT–E7 como el candidato más fuerte para su traslación clínica entre los evaluados y marcaron un precedente claro sobre la ventaja de redirigir los antígenos hacia el retículo endoplásmico.

Complementariamente, se han comparado distintas proteínas con localizaciones celulares diversas como posibles acarreadores antigénicos, observándose que únicamente la proteína residente del retículo endoplásmico ERP29 indujo efectos antitumorales significativos. El análisis demostró que la señal mínima necesaria para inducir esta respuesta correspondía a la combinación del PS y la secuencia de retención KDEL, confirmando que la localización en el RE es esencial para potenciar la inmunogenicidad de los antígenos [211].

El péptido señal de CRT también ha sido empleado con propósitos distintos a la clásica estrategia PS/KDEL o CRT, en la que E7 permanece en el RE para favorecer la ERQC/ERAD y su carga en MHC-I. En el caso de las quimeras SP-SA-E7-4-1BBL, el PS funciona únicamente como puerta de entrada al RE para permitir el plegado y posterior secreción del antígeno. La eficacia de este diseño se fundamenta en la multimerización de 4-1BBL y en la presentación cruzada del antígeno secretado, constituyendo un ejemplo de co-estimulación mediada por tránsito a través del RE, pero sin retención en dicho compartimento ni activación de las vías adaptativas de estrés reticular y ERAD previamente descritas [214, 215]. Este contraste ilustra la versatilidad con la que una misma señal de envío puede ser aprovechada en diferentes estrategias de inmunoterapia.

En paralelo, han surgido enfoques “de fuera hacia el RE” que muestran que el direccionamiento subcelular más una señal adyuvante tienen mayor eficacia que cada componente por separado. Conjugados que llevan el antígeno al RE y activan STING en paralelo potencian la presentación cruzada en células dendríticas y el control tumoral por encima del antígeno E7 con STING no direccionado al RE o (b) que el antígeno E7 solo, direccionado al RE. Esto refuerza que el “último kilómetro o tramo” (la llegada efectiva al RE) es crítico para optimizar TAP/PLC/ERAP y que el microentorno del RE puede modularse para mejorar la calidad y cantidad de complejos péptido:MHC-I [218, 219]. En las vacunas de ADN (PS/KDEL o CRT), esto no solo sitúa los antígenos en la maquinaria de ensamblaje péptido:MHC-I, sino que la sobrecarga luminal y la vía ERAD probablemente actúan como una “adyuvancia intracelular” inherente, de ahí que sin adyuvante presenten una respuesta antitumoral importante.

En este contexto, desde la biología celular e inmunitaria, el crosstalk UPR/ERAD-inmunidad ayuda a entender estos efectos: la vía IRE1 α y componentes de ERAD como HRD1/Sec11L se han implicado en funciones de optimización de células dendríticas y linfocitos T (expansión clonal, producción de IL-2 y memoria CD8⁺) [220–225]. En conjunto, el panorama apoya que existen mecanismos intrínsecos interconectados aún incompletamente explorados y que el RE es un nicho donde procesamiento antigénico y co-estimulación convergen; además, los datos favorecen el uso de co-estimuladores que convivan y potencien el direccionamiento al RE (**Figura 12**).

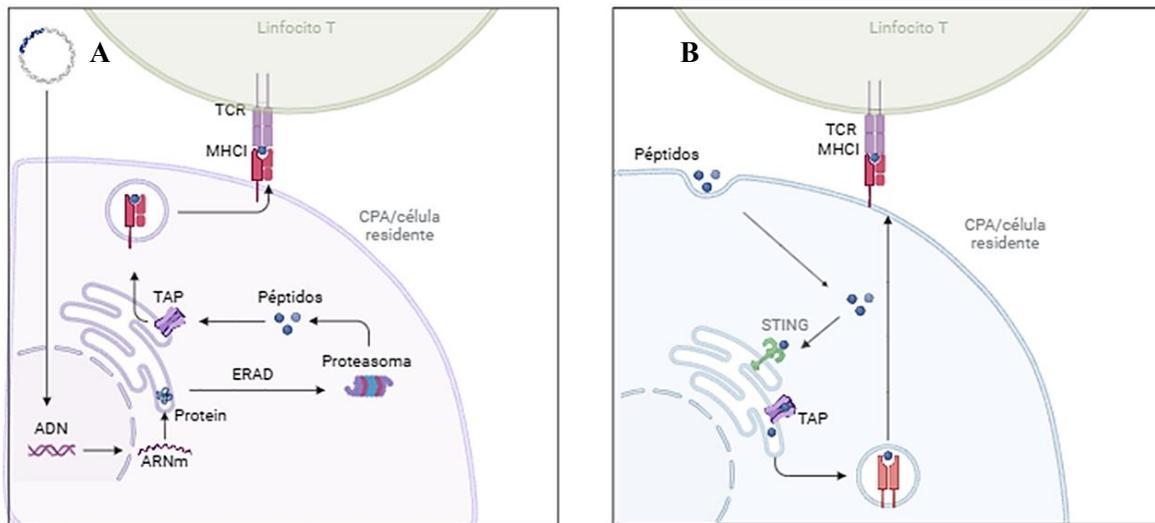


Figura 12. Estrategias de direccionamiento antigénico al RE en inmunoterapia contra VPH. (A) Vacunas de ADN con péptido señal/KDEL o fusión a calreticulina (CRT) dirigen el antígeno al lumen del RE, favoreciendo el procesamiento por ERQC/ERAD y la carga en MHC-I, con presentación directa a linfocitos T CD8⁺. La sobrecarga luminal y la activación de ERAD podrían favorecer mecanismos inmunológicos adyuvantes. (B) Estrategias “de fuera hacia el RE”, como conjugados que combinan antígeno y activadores de STING, facilitan la entrada del antígeno desde el exterior al RE y potencian la presentación cruzada y la inmunidad antitumoral. La convergencia de direccionamiento al RE y coestimulación (p. ej., STING) mejora la cantidad y calidad de complejos péptido:MHC-I y refuerza la activación de linfocitos T.

3. JUSTIFICACIÓN

Las estrategias actuales contra el cáncer no son del todo efectivas, por lo que es necesario seguir desarrollando nuevas alternativas que complementen las opciones terapéuticas convencionales. Este proyecto busca generar una vacuna basado en un sistema de envío y retención de antígenos en retículo endoplásmico con la adición del coestimulador CD40L. Lo anterior será evaluado en un modelo *in vitro*. Los resultados obtenidos en este proyecto sentarán las bases para mejorar esta estrategia y proporcionarán datos cruciales para futuros estudios traslacionales.

4. HIPÓTESIS

La adición del coestimulador CD40L a un sistema basado en el envío y retención de antígenos al retículo endoplásmico, es capaz de inducir un efecto biológico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar la funcionalidad de vectores basados en un sistema de envío y retención de antígenos al retículo endoplásmico y el coestimulador CD40L.

5.2. Objetivos específicos

1. Diseñar y caracterizar vectores que expresen el antígeno tumoral E7 flanqueado por señales de envío y retención en retículo endoplásmico y CD40L.
2. Determinar la expresión y localización de las proteínas E7 y CD40L por los vectores.
3. Analizar la actividad biológica de CD40L mediante ensayos *in vitro*.

Vectores

Se emplearon construcciones plasmídicas en vector eucariótico de la compañía Vector Builder, que incluyeron:

- Vector vacío (empty) como control negativo.
- PS-E7-KDEL, correspondiente al gen E7 de VPH-16 fusionado a una señal de envío y retención al retículo endoplásmico.
- CD40L, para la expresión del ligando co-estimulador.
- Plásmido bicistrónico PS-E7-KDEL-IRES-CD40L, diseñado con el uso de una secuencia de entrada interna ribosomal (IRES) para la co-expresión de ambos genes [226].

La clonación y propagación de los vectores se realizó en bacterias *Escherichia coli* DH5 α .

Se utilizaron enzimas de restricción comerciales de New England BioLabs: *SspI*, *PvuII* y *XmnI*.

Cultivo bacteriano

Se emplearon medios y suplementos estándar: LB Broth Miller (USBio), glicerol (Sigma-Aldrich), ampicilina y agua ultrapura para la propagación y almacenamiento de las bacterias competentes.

Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares HEK293 (ATCC CRL-1573) y RAW264.7 (ATCC TIB-71). Las células se cultivaron en medio DMEM (Sigma D5546) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco, 26140079), 1x de L-glutamina (Gibco, 35050061) y 1x de penicilina/estreptomicina (100 U/ml, Gibco, 15240062).

Las condiciones de incubación fueron a 37 °C, en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Para el subcultivo se empleó Tripsina-EDTA 0.25%, a un 80% de confluencia para proceder con los experimentos.

Se incluyeron materiales adicionales de uso en cultivo: PBS 1X pH 7.4 (Sigma Aldrich, P4417), DMSO (Sigma-Aldrich, C6164), azul tripán (Gibco, 15250061) y cámara de Neubauer (Marienfeld Germany).

Anticuerpos

- Anti-E7 monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, sc-65711), diluido 1:3000 en western blot y 1:50 en inmunofluorescencia.
- Anti- β -actina monoclonal de ratón (R&D Systems, MAB8929), diluido 1:5000 en western blot como control de carga.
- Anti-GRP78 policlonal de ratón (R&D Systems, MAB4846), diluido 1:500 en western blot y 1:50 en inmunofluorescencia.
- Anti-CD40L de cabra (R&D Systems, AF1163), empleado 1-1000 para western blot y 1-100 para inmunofluorescencia.

- Goat anti-mouse HRP (Invitrogen, 31430), empleado 1-5000 para detectar proteínas reconocidas por anti-E7 y anti- β -actina.
- Rabbit anti-goat HRP (Thermo Scientific, 30402), utilizado 1-3000 para la detección del anti-CD40L.
- Anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos donkey anti-mouse y donkey anti-goat (R&D Systems NL001 y NL009), diluidos 1:100 para inmunofluorescencia.

Reactivos y kits

Se emplearon los siguientes reactivos: Plasmid Midi Kit (QIAGEN), TurboFect™ Transfection Reagent (Fermentas Inc.), GelRed (Biotium), DAPI 0.1 mg/mL, Metanol 100%, Acetona, Triton X-100, Tween 20, TEMED, coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Thermo Fisher), acrilamida-bisacrilamida 30% (Bio-Rad) y reactivos de quimioluminiscencia west pico (Pierce).

Soluciones

Se prepararon: RIPA 1X (ATCC) complementado con inhibidores, buffer CutSmart 10X (NEB), buffer Tris-Glicina-SDS 1X, buffer de empaquetamiento 4X, buffer de carga 6X (NEB), TBST, persulfato de amonio al 10%, PBS 1X, PMSF (Sigma-Aldrich), DTT (Sigma-Aldrich), leche descremada al 10% en TBST, SDS 10% (USB), Tris-HCl 1.5M pH 8.8 y Tris-HCl 0.5M pH 6.8.

Materiales plásticos

Se emplearon: pipetas serológicas, cajas de cultivo celular de 75 cm² y 25 cm² (Corning), criotubos de 2 mL (Corning), viales de 2 mL, 1.7 mL y 0.65 mL, laminillas de 8 celdas (Lab-Tek II), placas de 6 pozos (Corning), cajas Petri de 78 cm² y 28 cm², tubos Falcon de 50 mL y 15 mL, matraces de 1 litro y membranas de PVDF (Bio-Rad).

Equipos

Se utilizó equipo estándar de laboratorio, incluyendo: micropipetas de distintos volúmenes, campana de bioseguridad nivel II, microscopio invertido, incubadora con CO₂ (Thermo), centrífugas y microcentrífugas refrigeradas (Sigma), vortex (Daigger), balanza analítica, cámara para geles de poliacrilamida (Bio-Rad), cámara de transferencia semihúmeda (Bio-Rad), lector de microplacas de ELISA (Bio-Rad iMark), escáner de quimioluminiscencia (LI-COR), transiluminador (Bio-Rad), microscopio de fluorescencia (Leica), cámara Infinity para microscopía de campo claro, contraste de fases y fluorescencia, microscopio confocal laser Leica TCS SP8. Se dispuso además de almacenamiento en congelador (-20 °C), ultracongelador (-80 °C, Thermo) y tanque de nitrógeno líquido.

6. METODOLOGÍA

6.1. Diseño de los vectores de expresión

Se diseñaron los vectores de expresión que codifican el antígeno tumoral E7, el cual fue flanqueado por secuencias señal de envío y retención en el retículo endoplásmico de la calreticulina [227], en conjunto con la molécula coestimuladora CD40L, con el objetivo de potenciar la presentación antigénica y la activación inmune. El diseño de los vectores se realizó utilizando el software Vector Builder, que permitió la construcción eficiente de las secuencias genicas y la integración precisa de los elementos necesarios para la expresión dirigida. Posteriormente, los vectores fueron analizados *in silico* para verificar su correcta organización estructural, marcos de lectura y la presencia de elementos regulatorios, asegurando su funcionalidad para aplicaciones en inmunoterapia dirigida contra tumores.

6.2. Purificación de ADN plasmídico

Las bacterias *E. coli* DH5 α transformadas fueron cultivadas durante la noche en medio LB suplementado con ampicilina y posteriormente recolectadas por centrifugación. La purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el *Plasmid DNA Midiprep Kit* de Qiagen, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Finalmente, el ADN fue resuspendido con 30 μ L de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del ADN purificado se determinaron mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm con un espectrofotómetro NanoDrop™.

6.3. Digestión con enzimas de restricción

Para realizar la caracterización de los vectores se llevó a cabo una digestión con enzimas de restricción previamente seleccionadas con el fin de confirmar la identidad y el tamaño esperado de los vectores purificados. Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante, usando 1 µg de ADN y 1 U de enzima, dejando incubar la reacción de toda la noche (16 horas). Los productos de la digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando un voltaje de 80 V durante una hora. En este análisis se incluyeron las siguientes muestras: un plásmido que codifica el antígeno tumoral E7 con las señales de envío y retención en el retículo endoplásmico (Ps-Ag(E7)-KDEL), otro plásmido que incluye además la secuencia IRES seguida del gen que codifica al ligando CD40L (Ps-Ag(E7)-KDEL-IRES-CD40L), un plásmido con el gen de CD40L sola, y un plásmido vacío como control. Esta estrategia permitió corroborar la correcta inserción y organización de las secuencias en cada construcción plasmídica.

Vectores de expresión:

1. Ps-Ag(E7)-KDEL
2. PS-Ag(E7)-KDEL-IRES-CD40L
3. CD40L
4. Plásmido vacío (control negativo)

6.4. Transfección de los vectores en cultivo celular

La transfección de células HEK293 se realizó utilizando el reactivo TurboFect Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Previamente, las células se sembraron en placas adecuadas para alcanzar un 80% de confluencia al momento de la transfección. El ADN plasmídico fue diluido en un volumen adecuado de medio libre de suero y antibióticos. Posteriormente, se añadió el reactivo

TurboFect directamente a la solución de ADN, mezclando con vórtex durante 5 segundos para favorecer la formación de complejos ADN-polímero catiónico. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la formación estable de los complejos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los complejos se añadieron gota a gota sobre las células previamente cultivadas en medio con suero, sin remover el medio de cultivo. Las células se incubaron bajo condiciones estándar (37 °C, 5 % CO₂) durante 48 horas, dependiendo del objetivo experimental, para permitir la expresión de los genes de interés. La expresión de las proteínas codificadas fue posteriormente evaluada mediante diferentes técnicas de inmunodetección, según el diseño experimental.

6.5. Análisis de expresión de proteínas por western blot

La técnica de western blot se realizó en condiciones desnaturizantes. En primer lugar, las células fueron lavadas con PBS 1x y lisadas utilizando 25 µl de buffer de lisis (RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa), para extraer las proteínas totales. Los lisados se centrifugaron a 10,000g durante 5 minutos a 4 °C para eliminar residuos celulares, y el sobrenadante fue recuperado para cuantificación. La concentración proteica se determinó mediante la técnica de Bradford. Posteriormente, se prepararon 25 µg de las muestras mezclándolas con buffer de carga y se calentaron a 95 °C durante cinco minutos para desnaturizar las proteínas. Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) junto con un marcador de peso molecular, y se realizó la electroforesis para separar las proteínas según su tamaño a 80 V por 1 hora. Una vez completada la corrida, las proteínas en el gel de poliacrilamida, fueron transferidas a una membrana de PVDF mediante electrotransferencia semi-húmeda a 120 mA, durante 1 hora. La membrana se bloqueó

durante una hora a 4 °C en agitación lenta con una solución bloqueadora (leche al 10% en TBS-T) para prevenir la unión inespecífica de anticuerpos. Luego, se incubó con los anticuerpos primarios específicos para E7 (Santa Cruz), CD40L (R&D), GRP78 (R&D) y β -actina (Santa Cruz) para la detección de las proteínas de interés. Los anticuerpos primarios fueron diluidos 1:1000 en solución de bloqueo e incubados durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con TBS-T y posteriormente se incubó la membrana 2 horas a 4 °C en agitación lenta con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (Thermo), específico para la especie del anticuerpo primario, usando una dilución 1:5000. Finalmente, la detección se llevó a cabo utilizando un sustrato quimioluminiscente (Pierce), y la señal fue visualizada mediante un sistema de adquisición de imágenes digitales (C-DiGit LI-COLOR). La intensidad de las bandas fue analizada mediante software Image Studio por densitometría, permitiendo evaluar la expresión relativa de la proteína objetivo.

6.6. Análisis de la localización subcelular por inmunofluorescencia

Para evaluar la expresión y localización intracelular de las proteínas E7 y CD40L, se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia indirecta en células transfectadas con distintos vectores. Las células HEK293 fueron fijadas con metanol durante 10 minutos y posteriormente tratadas con acetona durante 1 minuto para permeabilizar la membrana celular. Adicionalmente, se utilizó Tritón X-100 al 0.5 % para favorecer la permeabilización. Una vez fijadas y permeabilizadas, las células fueron lavadas tres veces con PBS y posteriormente fueron incubados a T.A durante 1 hora. con BSA al 1 % para bloquear sitios inespecíficos. En un protocolo alternativo se probó la fijación con PFA al 4% sin permeabilizar.

Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios anti-E7 y anti-CD40L (dilución 1:50) en PBS 1x BSA 1%, seguidos de lavados 3 lavados con PBS 1x y la incubación de 1 hora a T.A en oscuridad con anticuerpos secundarios anti-IgG conjugados a fluoróforos (dilución 1:100) (R&D) en PBS 1x BSA 1%. Después de la incubación con los anticuerpos, se tiñeron los núcleos celulares utilizando DAPI durante 10 minutos para permitir la identificación nuclear. Finalmente, las células fueron lavadas nuevamente con PBS, montadas en portaobjetos y observadas bajo un microscopio de fluorescencia Leica DM100. Las imágenes fueron adquiridas utilizando el software Q-Capture Pro 7. Las muestras fueron de igual manera enviadas a analizar por microscopía confocal a los laboratorios centrales del CINVESTAV Unidad Zacatenco.

6.7. Ensayo de actividad biológica por ELISA

Se evaluó la funcionalidad biológica del ligando CD40L mediante un ensayo *in vitro* basado en la activación de macrófagos murinos RAW264.7 y la cuantificación de IL-12 por ELISA. Primero, en placa de 24 pozos 60,000 células HEK293 y 30,000 RAW264.7 fueron transfectadas con el vector que codifica CD40L y se incubaron durante 24 horas para permitir la expresión del ligando. Posteriormente, se sembraron 80,000 células RAW264.7 por pozo, las cuales fueron estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) durante 24 horas y co-cultivadas junto a las células previamente transfectadas. El co-cultivo celular se mantuvo durante 24 a 48 horas, tiempo durante el cual se esperaba la interacción funcional entre CD40L expresado en HEK293 y los receptores presentes en los macrófagos. La producción de IL-12 murina fue utilizada como indicador de activación inmunológica, y su concentración en el sobrenadante fue determinada mediante un ensayo de ELISA comercial (ThermoFisher

Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este protocolo permitió evaluar si la expresión de CD40L por parte de las células transfectadas era capaz de inducir una respuesta biológica en células inmunes efectoras.

6.8. Ensayo de actividad biológica mediante análisis morfológico

Para evaluar la actividad biológica de CD40L, se utilizó la línea celular murina RAW264.7. Se sembraron 30,000 células por pocillo en placas de cultivo, y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente, se transfectaron con los vectores y se permitió su interacción con las células por 24 horas adicionales. Luego de la transfección, las células se mantuvieron en cultivo por 24 o 48 horas. Al finalizar cada periodo, se realizó un análisis morfológico utilizando el microscopio óptico Leica DM100 para evaluar cambios inducidos por los diferentes tratamientos.

6.9. Análisis estadístico

Todas las variables cuantitativas fueron registradas y organizadas en una hoja de cálculo utilizando Excel y los resultados se presentaron como promedio \pm desviación estándar (DE). Para el análisis estadístico, se empleó el software GraphPad Prism 8. De acuerdo con los resultados obtenidos, se aplicaron pruebas estadísticas paramétricas (como la *t* de Student, pareada o no pareada, y ANOVA) o no paramétricas (Mann–Whitney o Kruskal–Wallis), según correspondiera.

7. RESULTADOS

7.1. Diseño de los vectores que expresan E7 y CD40L

Se diseñaron y caracterizaron vectores de expresión que codifican el antígeno tumoral E7, el cual fue flanqueado por secuencias señal de envío y retención en el retículo endoplásmico de la calreticulina, así como r la proteína coestimuladora CD40L, con el objetivo de potenciar la presentación antigénica y la activación inmune. El diseño de los vectores se realizó utilizando el software Vector Builder, que permitió la construcción eficiente de las secuencias genéticas y la integración precisa de los elementos necesarios para la expresión dirigida (**Figura 13**). Posteriormente, los vectores fueron analizados *in silico* para verificar su correcta organización estructural, marcos de lectura y la presencia de elementos regulatorios, asegurando su funcionalidad para aplicaciones en inmunoterapia dirigida contra tumores.

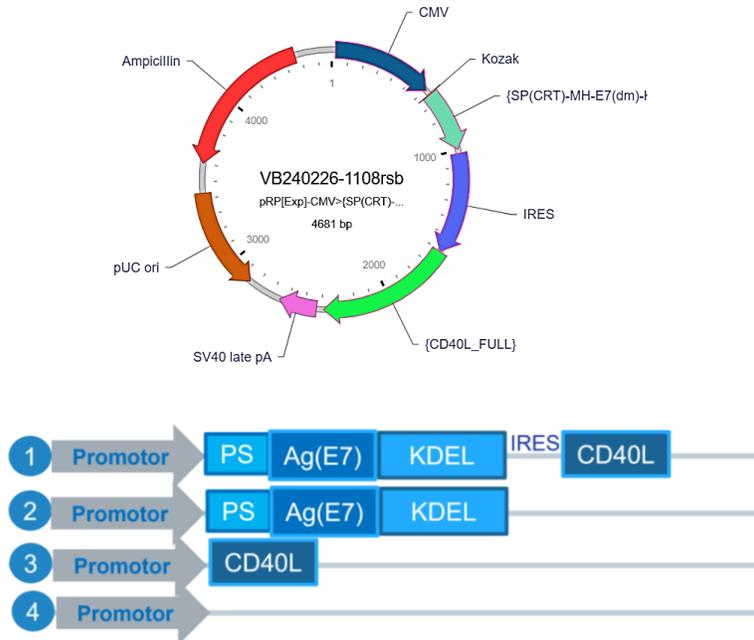


Figura 13. Diseño y caracterización de los vectores de expresión. Diseño esquemático del vector de expresión que codifica el antígeno tumoral E7 flanqueado por señales de envío y retención al retículo endoplásmico, junto con la proteína coestimuladora CD40L. Se diseñaron 4 vectores que incluyen regiones promotoras, señal de secreción, dominios de retención (KDEL), y/o secuencia IRES y secuencia de CD40L.

7.2. La caracterización de los vectores revela los fragmentos del tamaño esperado

Para confirmar la identidad y la integridad estructural de los vectores construidos, se realizó una digestión con las enzimas *SspI*, *PvuII* y la combinación de ambas enzimas, seguida de análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón TBE. En la figura se presentan los resultados correspondientes a dos construcciones plasmídicas: una que codifica únicamente el antígeno tumoral E7, y otra que codifica E7 junto con el ligando CD40L (**Figura 14**). Los vectores sin digestión (N) mostraron una banda única correspondiente al plásmido en su conformación superenrollada. Tras la digestión con *SspI* o *PvuII*, se observaron patrones de bandas consistentes con la liberación de fragmentos del tamaño esperado, lo que indica cortes exitosos por parte de las enzimas. En las muestras tratadas con la combinación *SspI/PvuII*, se liberaron dos bandas bien definidas, lo que confirmó que ambos sitios de restricción estaban presentes y funcionales en las construcciones. Tanto en el caso del vector que contiene únicamente E7, como en el que contiene E7-CD40L, se observó una digestión eficiente y liberación de fragmentos compatibles con el diseño teórico de los vectores, lo cual validó la correcta inserción de las secuencias de interés.

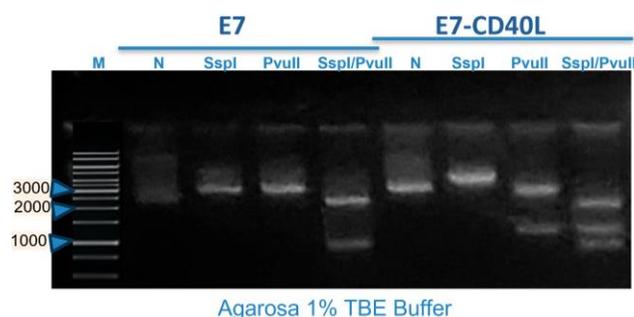


Figura 14. Caracterización de los vectores E7 y E7-CD40L. La digestión de los vectores E7 y E7-CD40L con enzimas de restricción confirmó la liberación de fragmentos del tamaño esperado, validando la correcta inserción. Análisis por digestión enzimática de los vectores E7 y E7-CD40L. La digestión con *SspI*, *PvuII* y su combinación liberó fragmentos con los tamaños esperados, confirmando la correcta inserción y organización de las secuencias en los vectores. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1 % con buffer TBE.

Por otro lado, se evaluó la integridad de las construcciones plasmídicas correspondientes al vector que expresa CD40L y al vector vacío, mediante digestión con las enzimas *SspI*, *PvuII*, *XmnI* y sus combinaciones, seguida de electroforesis en gel de agarosa al 1 % con buffer TBE. Las muestras sin digestión (N) mostraron bandas correspondientes a las formas superenrolladas. En el caso del vector que codifica CD40L, la digestión con *SspI* o *PvuII* generó fragmentos de tamaño compatible con el diseño teórico del plásmido, mientras que la digestión doble con *SspI/PvuII* mostró una separación clara en dos bandas, confirmando la presencia y orientación correcta del inserto. Por otro lado, en el vector vacío, la digestión con *SspI*, *PvuII* y la combinación *SspI/XmnI* produjo patrones consistentes con la ausencia del gen insertado, lo que permitió diferenciarlo claramente de las construcciones recombinantes. Estos resultados confirmaron la identidad de ambos vectores, así como la funcionalidad de los sitios de restricción utilizados para su validación (**Figura 15**).

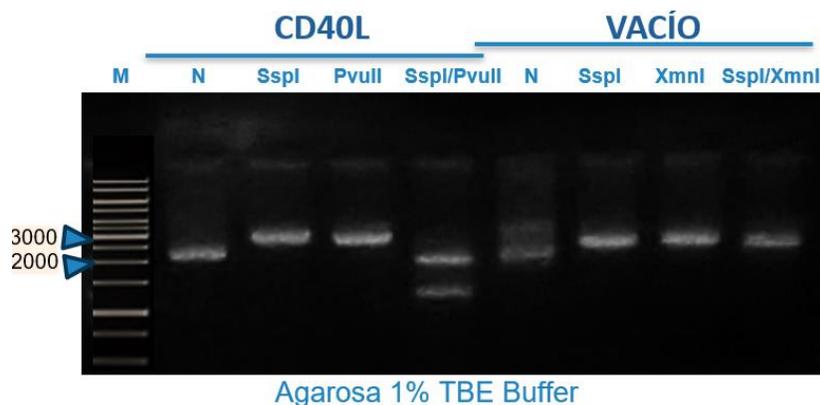


Figura 15. Caracterización de vectores CD40L y vector vacío. Análisis por digestión enzimática de los vectores CD40L y vector vacío. Las digestiones individuales y combinadas con *SspI*, *PvuII* o *XmnI* generaron fragmentos de los tamaños esperados, confirmando la presencia del inserto en el vector CD40L y la ausencia de este en el vector vacío. La separación se realizó en gel de agarosa al 1 % con buffer TBE.

7.3. Expresión de E7 y CD40L e inducción de la respuesta de estrés en ER

Se evaluó la expresión de las proteínas E7 y CD40L mediante Western blot, así como la activación de la respuesta de estrés del retículo endoplásmico en células HEK293 transfectadas con diferentes vectores. Se utilizaron anticuerpos específicos contra E7, CD40L y GRP-78 (un marcador de estrés del retículo endoplásmico [228]), además de β -actina como control de carga. Se detectaron bandas específicas correspondientes a E7 (18 kDa) en las muestras transfectadas con los vectores E7 y E7-CD40L, y a CD40L (33 kDa) en los grupos CD40L y E7-CD40L, confirmando la expresión de ambas proteínas según el diseño de cada construcción. En cuanto a GRP-78 (78 kDa), se observó una mayor intensidad de señal en las células transfectadas con el vector E7-CD40L, en comparación con los demás grupos, lo que sugiere activación de la respuesta de estrés del retículo endoplásmico en esta condición. No se observaron señales específicas en las células transfectadas con el vector vacío ni en el control sin tratamiento (S/T) (Figura 16).

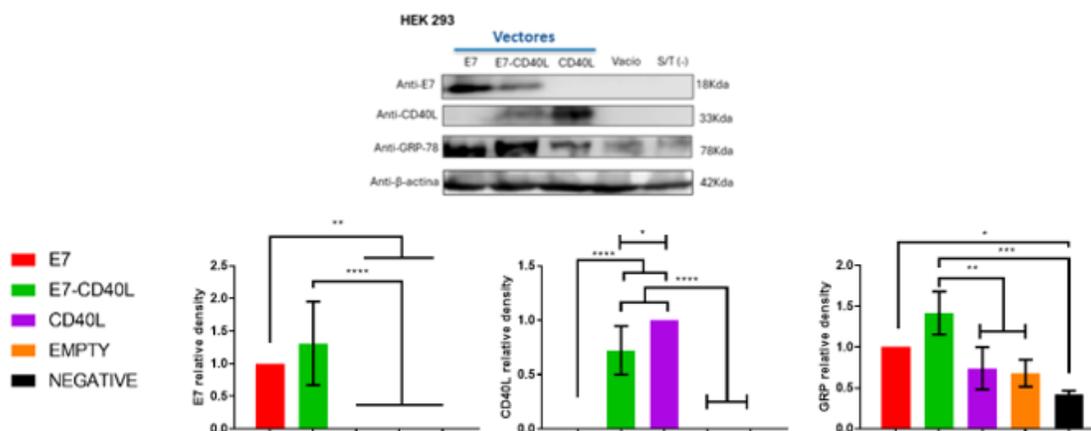


Figura 16. Expresión de E7, CD40L y GRP-78 como marcador de estrés en RE. Expresión de E7, CD40L y marcador de estrés de RE (GRP-78) en células HEK293 transfectadas con los diferentes vectores. En la parte superior se muestran los resultados de western blot para las proteínas E7 (18 kDa), CD40L (33 kDa), GRP-78 (78 kDa) y β -actina (42 kDa) como control de carga. Se observó expresión de E7 en los grupos E7 y E7-CD40L, y de CD40L en los grupos CD40L y E7-CD40L. La expresión de GRP-78 se incrementó particularmente en el grupo E7-CD40L. La parte inferior muestra la cuantificación de la densidad relativa de las bandas correspondientes a E7, CD40L y GRP-78, normalizadas contra β -actina. Se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, especialmente en E7-CD40L en comparación con los controles. Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA con pruebas post hoc; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.005$, **** $P \leq 0.001$.

7.4 La proteína CD40L se localiza en la membrana celular

Se analizó la expresión y localización intracelular de las proteínas E7 y CD40L en células HEK293 transfectadas con distintos vectores mediante inmunofluorescencia. Las células fueron tratadas con inmunodetección indirecta contra E7 (verde) y CD40L (rojo), y los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). En las células transfectadas con el vector E7, se observó una señal intensa para E7 con localización citoplasmática difusa, sin expresión detectable de CD40L. En el grupo E7-CD40L, se detectó la expresión simultánea de ambas proteínas, con una señal evidente de E7 y una distribución periférica de CD40L, lo que sugiere localización en membrana o vesículas cercanas. En las células transfectadas únicamente con el vector CD40L, la expresión se restringió al marcador rojo, con una localización similar, y no se detectó señal de E7. En el grupo transfectado con el vector vacío, no se observó señal específica para ninguna de las dos proteínas, confirmando la especificidad de los anticuerpos utilizados. Estos resultados confirmaron que los vectores diseñados permitieron la expresión dirigida de E7 y CD40L, tanto de forma individual como en combinación, y revelaron su distribución intracelular en las células HEK293 (**Figura 17**).

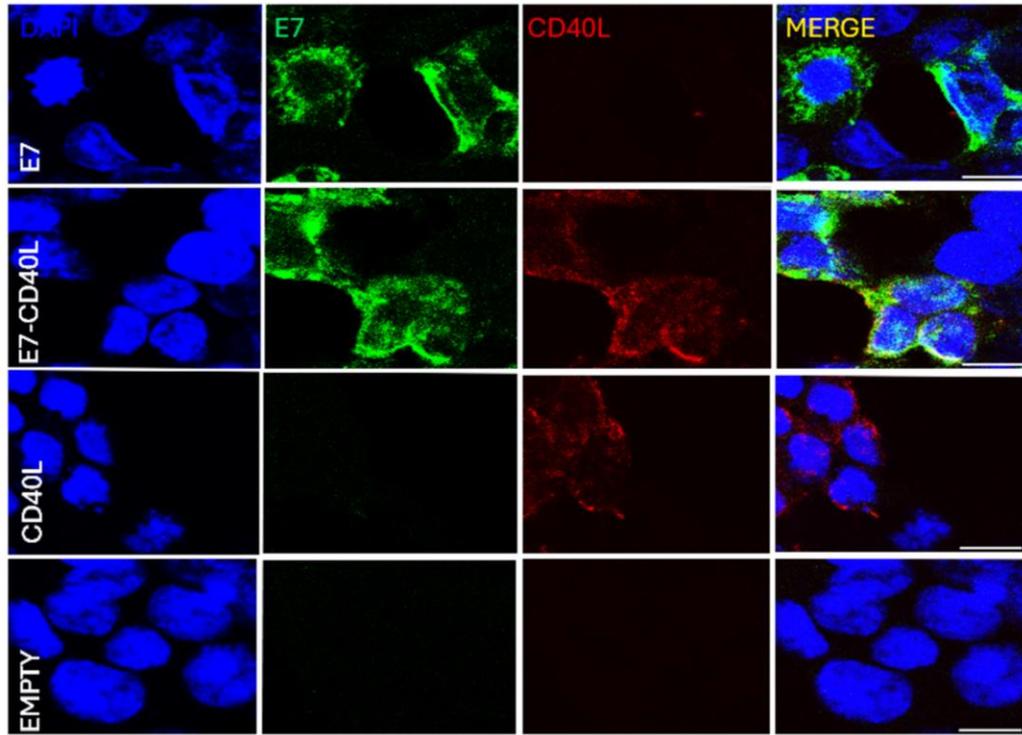


Figura 17. Imágenes de inmunofluorescencia en células HEK293 fijadas con metanol. Las células fueron transfectadas con vectores que codifican E7 y CD40L. Se observó localización citoplasmática de E7 (verde) y expresión periférica de CD40L (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Barras de escala: 10 μ m.

También, se analizó la expresión y distribución intracelular de las proteínas E7 y CD40L en células HEK293 transfectadas con diferentes vectores, mediante microscopía confocal. Las células fueron fijadas con PFA al 4% y marcadas con anticuerpos específicos contra E7 (verde) y CD40L (rojo), y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) en inmunofluorescencia indirecta. Se adquirieron 3 stacks de la zona media del citoplasma celular en los planos XY, así como proyecciones ortogonales XZ y YZ para evaluar la localización tridimensional de las proteínas. Adicionalmente, se generaron perfiles de intensidad de fluorescencia (RFU) en función de la distancia para estudiar la colocación subcelular relativa entre los marcadores. En las células transfectadas únicamente con el vector E7, se observó una fuerte señal de E7 en el citoplasma, sin detección de CD40L. En el grupo E7-CD40L, se evidenció

la expresión simultánea de ambas proteínas, con una distribución parcialmente superpuesta en las imágenes de fusión (MERGE) y en los perfiles de fluorescencia. Las células transfectadas con el vector CD40L mostraron una expresión intensa de CD40L, predominantemente en la periferia celular, sin señal de E7. Por último, las células transfectadas con el vector vacío no mostraron señal específica para ninguna de las proteínas, sirviendo como control negativo (**Figura 18**).

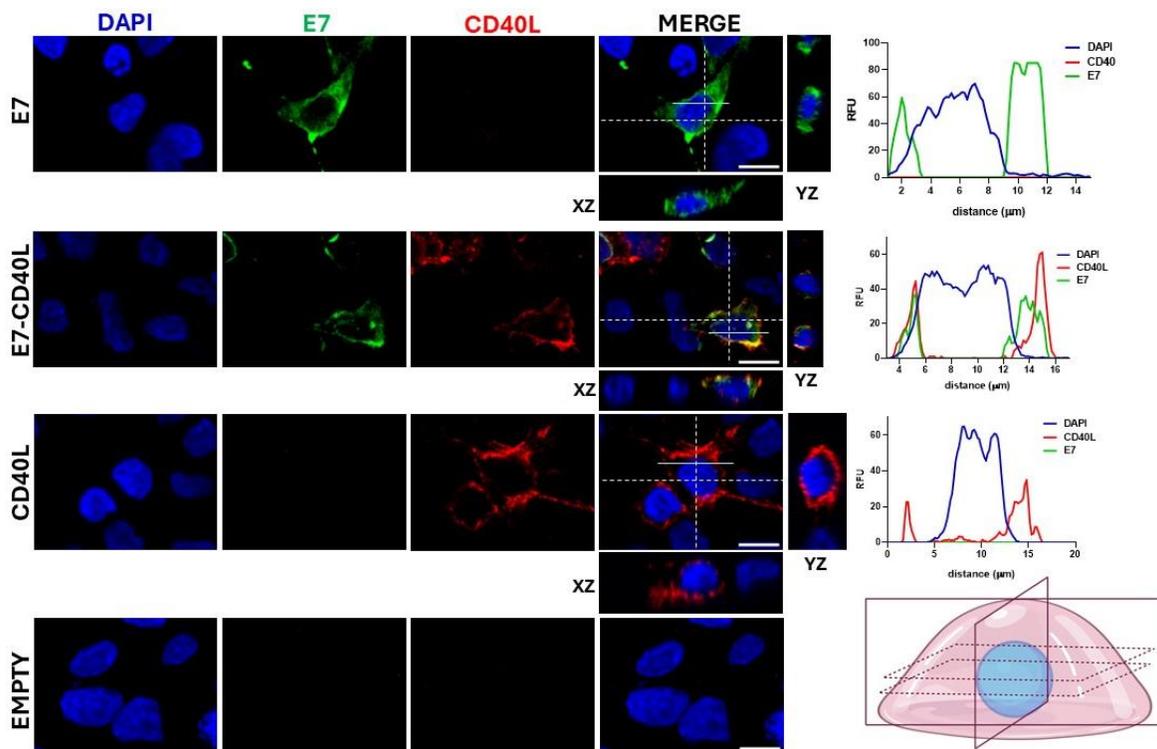


Figura 18. Análisis por microscopía confocal de células HEK293. Células transfectadas con vectores que codifican E7, CD40L, ambos (E7-CD40L), o vector vacío. Las células fueron marcadas con DAPI (azul), anti-E7 (verde) y anti-CD40L (rojo). Se muestran imágenes en plano XY, proyecciones ortogonales (XZ, YZ), y perfiles de fluorescencia relativa (RFU) en función de la distancia. Se observó colocalización parcial de E7 y CD40L en el grupo E7-CD40L, mientras que en los grupos individuales se detectó expresión específica. Escala: 10μm.

7.5 El vector que codifica CD40L induce la secreción de IL-12 en macrófagos

Se evaluó la actividad biológica del vector que codifica CD40L mediante la cuantificación de la producción de IL-12p70 en co-cultivos celulares con macrófagos RAW264.7, utilizando dos líneas celulares distintas: HEK293 y RAW264.7. En ambos modelos, se realizaron co-cultivos en presencia o ausencia de LPS y se analizaron los sobrenadantes a las 24 y 48 horas mediante un ensayo de ELISA.

En el caso de las células HEK293, se observó un incremento moderado en los niveles de IL-12p70 cuando el vector CD40L fue co-expresado y se estimuló con LPS, tanto a las 24 como a las 48 horas. Sin embargo, la magnitud de esta inducción fue limitada en comparación con la respuesta obtenida en los experimentos realizados con la línea celular RAW264.7.

En contraste, cuando las propias células RAW264.7 fueron transfectadas con el vector CD40L, se detectó un aumento notable en la secreción de IL-12p70, especialmente bajo estimulación con LPS a las 24 horas. Esta respuesta fue consistente tanto en la medición a las 24 como a las 48 horas, superando claramente los niveles observados en el modelo con células HEK293. Los resultados sugieren que la línea RAW264.7 no solo responde de manera más robusta a la señalización de CD40L, sino que también actúa como un sistema más eficaz para amplificar la producción de IL-12 en presencia de un estímulo inflamatorio como el LPS a las 24 horas, mientras que a las 48 horas la presencia del estímulo fue similar que sin este. En conjunto, estos resultados indican que la línea celular RAW264.7 representa un modelo más adecuado para evaluar la funcionalidad biológica del vector CD40L, ya que permite una respuesta inmunológica más potente y sostenida que la línea HEK293 en condiciones equivalentes.

Los resultados mostraron que ambas líneas celulares fueron capaces de inducir la producción de IL-12 en presencia del ligando CD40L. Sin embargo, se observó que las células RAW264.7 transfectadas con CD40L generaron una respuesta más potente, especialmente a las 48 horas, alcanzando concentraciones de IL-12p70 cercanas a los 150–175 pg/mL. Por otro lado, las HEK293 transfectadas con CD40L, aunque también funcionales, indujeron niveles ligeramente menores de IL-12 en los macrófagos receptores. Esta diferencia podría explicarse por una mejor compatibilidad de membranas, receptores coestimuladores compartidos o diferencias en la expresión de moléculas accesorias. En ambos casos, se confirmó que el vector que codifica CD40L es biológicamente activo, pero su efecto puede variar dependiendo del tipo celular que lo exprese (**Figura 19**).

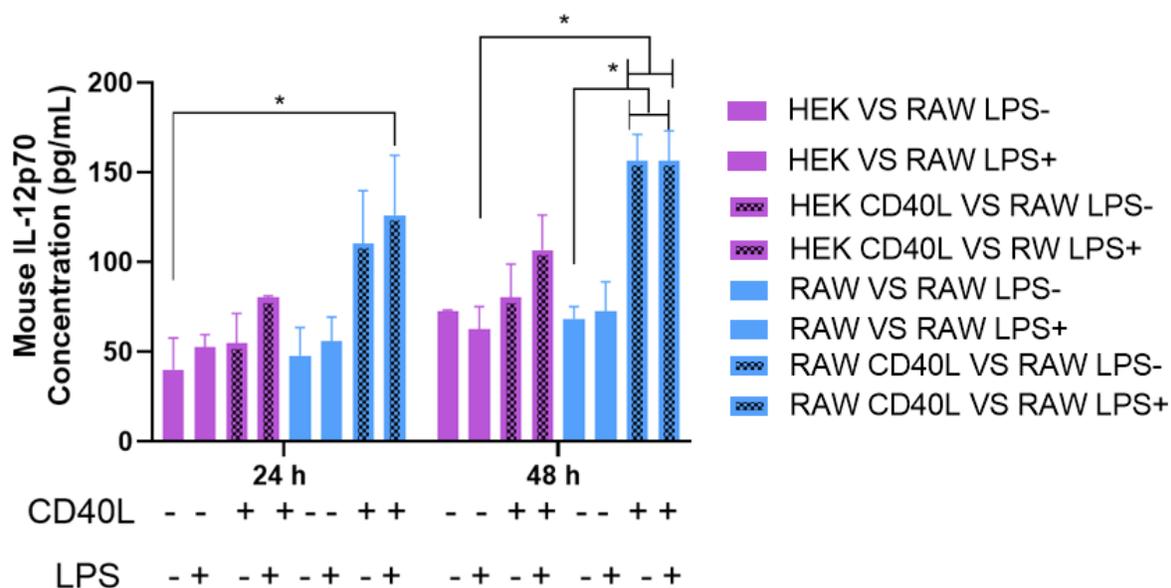


Figura 19. Comparación estadística de la actividad biológica entre co-cultivos. Se observó una mayor producción de IL-12p70 en co-cultivos autólogos de macrófagos RAW264.7 transfectados con CD40L, especialmente a las 48 h. Las células HEK293 transfectadas también indujeron IL-12, pero con menor intensidad. Se utilizó LPS como estímulo inflamatorio y ELISA para cuantificación. $P \leq 0.05$.

7.6 El vector que codifica CD40L induce cambios en la morfología de los macrófagos

Se analizaron los cambios morfológicos inducidos por el vector que codifica CD40L en macrófagos RAW264.7 en co-cultivo con células HEK293, en condiciones con y sin estímulo con LPS. En los grupos co-cultivados con HEK293 transfectadas con CD40L, las células RAW264.7 mostraron una morfología alargada, con proyecciones citoplasmáticas y mayor dispersión, características asociadas a un fenotipo de activación [229]. Estos cambios fueron más acentuados con el estímulo de LPS. En contraste, los co-cultivos con HEK293 no transfectadas no presentaron modificaciones notables en la morfología de los macrófagos, los cuales conservaron una forma redondeada, agrupada y sin extensión de prolongaciones celulares, indicando un estado basal o no activado. Asimismo, los grupos controles de RAW264.7 en co-cultivo con células que no expresan CD40L y sin LPS, tampoco mostraron cambios morfológicos significativos comparables a los inducidos por CD40L. Estos resultados sugieren que el co-cultivo de macrófagos con células que expresan CD40L (ya sean HEK293 o la misma línea celular RAW264.7) es capaz de inducir cambios morfológicos asociados a la activación de macrófagos (recuadros verdes), lo cual refuerza que la proteína CD40L producida por los vectores diseñados poseen actividad biológica (**Figura 20**).

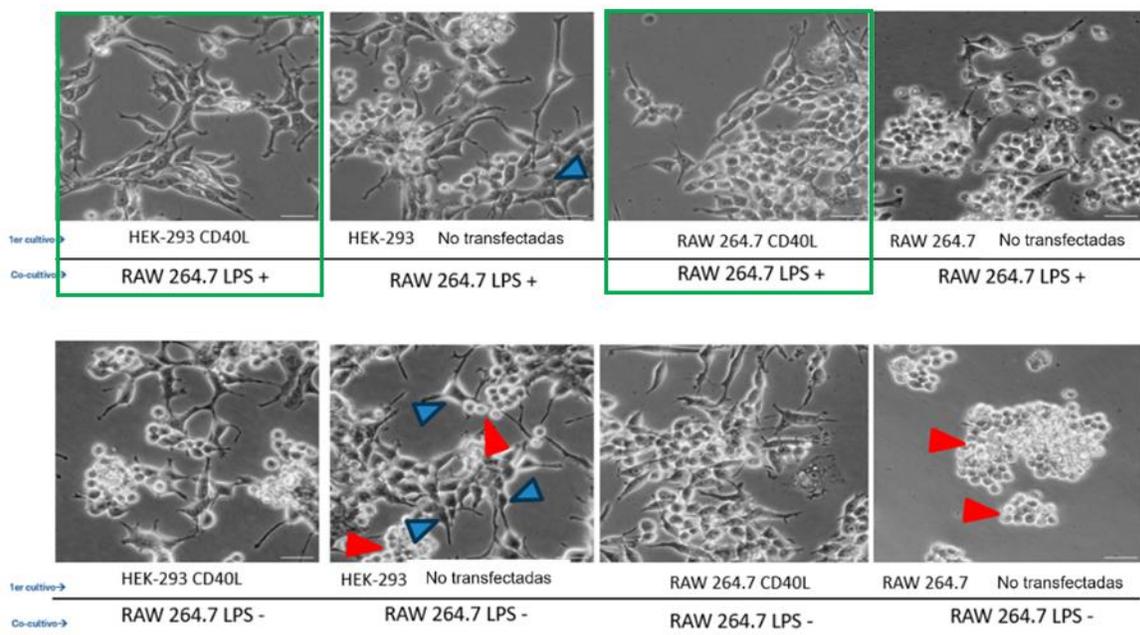


Figura 20. Cambios morfológicos en macrófagos inducidos por CD40L en co-cultivo. Se muestran imágenes representativas de co-cultivos entre células HEK293 (transfectadas o no con el vector que codifica CD40L) y macrófagos RAW264.7 tratados o no con LPS. Los macrófagos co-cultivados con HEK293-CD40L presentaron morfología alargada y dispersión celular, indicativa de activación. En cambio, los macrófagos co-cultivados con HEK293 no transfectadas conservaron una morfología redondeada y agrupada. Las imágenes corresponden a observaciones a las 24 h del co-cultivo mediante microscopía de contraste de fases (barra de escala: 20 μ m).

A continuación, se muestran los cambios morfológicos en células RAW264.7 inducidos por diferentes tratamientos: vector vacío, PsAg(E7)-KDEL (E7), PsAg(E7)-KDEL-IRES-CD40L (E7-CD40L), y CD40L a 0, 24 y 48 horas post-transfección.

A las 0 h, las células en todos los grupos muestran una morfología redondeada característica de los macrófagos en reposo, sin cambios notables entre condiciones. Sin embargo, a partir de las 24 h, los grupos tratados con vectores que contienen CD40L (E7-CD40L y CD40L) mostraron signos evidentes de activación celular, como elongación, extensión de pseudópodos y una mayor dispersión celular, en contraste con el grupo vacío y E7, donde las células mantienen una morfología más compacta y redondeada.

Estas diferencias se acentúan a las 48 h, momento en el cual las células tratadas con E7-CD40L y CD40L presentan una morfología alargada y con muchas ramificaciones muy finas, compatible con un fenotipo de macrófago activado, mientras que las células en los grupos vacío y E7 presentan una morfología más conservada con pocas prolograciones gruesas de su citoplasma, indicando un menor nivel de activación (**Figura 21**).

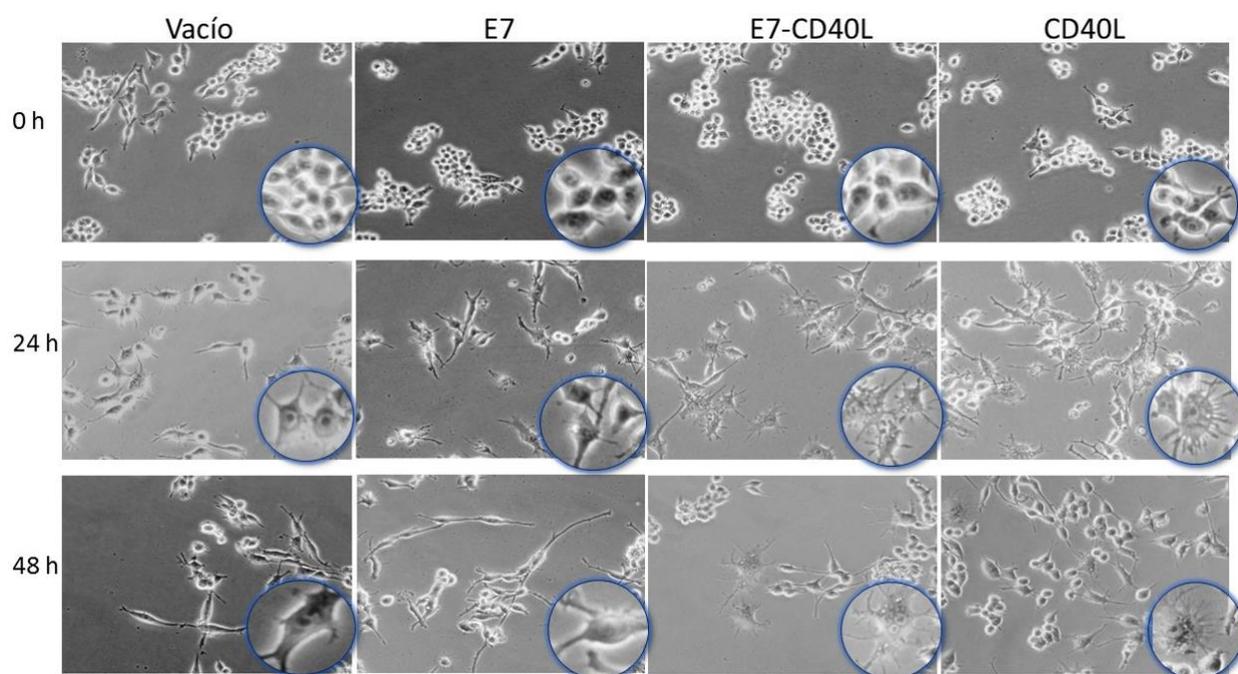


Figura 21. Análisis morfológico de macrófagos transfectadas con los diferentes vectores. Se muestran micrografías representativas a 0, 24 y 48 horas después del co-cultivo con células transfectadas con vector vacío, PsAg(E7)-KDEL (E7), PsAg(E7)-KDEL-IRES-CD40L (E7-CD40L), y CD40L. Los recuadros azules indican detalles morfológicos ampliados que ilustran cambios en la forma celular. Se observa una transición de morfología redondeada a una morfología alargada y ramificada principalmente en los grupos E7-CD40L y CD40L, lo cual es indicativo de activación morfológica de los macrófagos. Escala: 20 µm.

8. DISCUSIÓN

Los datos del presente estudio demuestran que un vector bicistrónico separado por IRES es suficiente para coexpresar dos módulos con destinos celulares y funciones diferentes sin interferencia mutua: E7 con PS/KDEL se enriquece en el RE, mientras que CD40L, que porta su dominio transmembrana, se localiza en la membrana plasmática. Esta arquitectura evita los compromisos de las proteínas de fusión (p. ej., enmascaramiento de señales, restricciones estequiométricas o de plegamiento) y responde a una preocupación recurrente de los diseños usando IRES (menor traducción del segundo cistrón) [230–232]: aquí CD40L no solo se expresó, sino que fue funcional, lo que valida la estrategia.

La localización se corroboró con microscopía confocal (planos XY y cortes ortogonales XZ/YZ), donde E7 mostró patrón compatible con compartimentos del RE/citoplasma perinuclear y CD40L una distribución periférica de membrana. De forma consistente, los distintos protocolos de fijación aportaron resultados concordantes con esta distribución:

- PFA 4 % (entrecruzante) preserva arquitectura de membrana y epítomos conformacionales, por lo que favorece la detección de CD40L en superficie.
 - Metanol/acetona/tritón (precipitación/deslipidación) permeabiliza de forma amplia, expone epítomos internos y puede extraer lípidos, lo que facilita ver antígenos luminales/intracelulares (E7 en RE), pero puede reducir señal de proteínas de membrana o ocultar epítomos sensibles a deshidratación [233–235].
- Estos protocolos resultaron en lo siguiente: CD40L se ve mejor con PFA, mientras

que E7 se evidencia mejor con metanol/acetona/tritón al tener una distribución intracelular.

La señal PS/KDEL que lleva E7 al RE aumentó GRP78, indicador de estrés del RE/UPR, en ausencia de inducción equivalente por la expresión de CD40L solo. Esto sugiere que la sobresaturación luminal (E7-PS/KDEL) es la causa principal, en línea con el modelo en el que la sobrecarga de proteínas activa ERQC/ERAD y, con ello, la retrotranslocación y generación de péptidos aptos para MHC-I. Así mismo, la versión E7dm con mutaciones que le generan inestabilidad estructural por alteración del dominio tipo dedo de zinc [236], favorece el mal plegamiento y, por ende, la activación adicional de la vía ERQC/ERAD. En otras palabras, E7 y CD40L coexisten en la misma célula, pero transitan y se procesan por rutas distintas: E7 alimenta el eje RE-ERAD-proteasoma-TAP/PLC/ERAP, y CD40L señala desde la membrana.

Más allá de la presencia en membrana, CD40L fue funcional: en RAW264.7 observamos capacidad de inducir IL-12p70 (efecto independiente de LPS [237, 238]) y un fenotipo morfológico de activación (elongación, protrusiones), consistente con interacción ligando–receptor y la forma trimérica activa de CD40L. Esta lectura basada en morfología, junto con ELISA, ofrece un ángulo complementario para cuantificar coestimulación y mitiga la duda sobre el desempeño del segundo cistrón en esquemas IRES. Adicionalmente, el uso del promotor CMV asegura una expresión robusta de CD40L [239–241], suficiente para alcanzar membrana plasmática y ejercer función biológica en células blanco, incluso en un contexto de sobrecarga del RE.

Conjuntamente, los resultados apoyan un modelo de doble eje:

1. E7 direccionado al RE incrementa el estrés reticular adaptativo y flujo ERAD, sosteniendo un suministro de péptidos en el sitio de carga de MHC-I;
2. CD40L en membrana provee señal coestimuladora a células mieloides y linfocitos, potenciando la activación inmunitaria.

Crucialmente, uno no compromete al otro: el procesamiento centrado en RE coexiste con CD40L en membrana y activo, dentro del mismo vector. Estos hallazgos refuerzan la lógica de enviar antígenos al RE en vacunas terapéuticas frente a VPH: se optimiza la presentación MHC-I (relevante para lesiones virales y tumorales) y se añade un módulo coestimulador. En otras palabras, más antígeno “donde se carga y presenta” y más coestimulación “donde se activa al sistema inmune” se traducen en mejor potencial antitumoral.

La coestimulación mediada por CD40L se ha incorporado de múltiples formas con efectos relevantes pero con compromisos prácticos: (i) cócteles de vectores de doble promotor (antígeno y CD40L) aumentan linfocitos CD8⁺, pero dependen de cotransfección y ajuste de dosis por separado; (ii) enfoques *ex vivo* con DC cargadas con antígeno y refuerzo de CD40L intratumoral logran respuestas terapéuticas notables, pero a costa de complejidad logística; (iii) fusiones solubles antígeno-CD40L amplían el alcance paracrino, pero pueden comprometer el plegamiento y la trimetrización nativa de CD40L [84, 87, 88].

Ensayos exploratorios de modelado estructural (AlphaFold, datos no mostrados) indicaron que forzar CD40L en una fusión multimonómero mediante linkers desestabiliza la geometría del trímero, reforzando la elección bicistrónica para preservar la bioactividad y, a la vez, permitir trayectorias subcelulares independientes (RE para E7; membrana para CD40L).

Este planteamiento dialoga con los nodos de evasión del VPH: E5 reduce el transporte de MHC-I, E6/E7 afectan el aparato de presentación y la maduración de APC [33–44]; PS/KDEL incrementa la visibilidad antigénica al ubicar E7 en el “último tramo” (TAP/PLC/ERAP), y CD40L licencia DC (aumento de IL-12, *cross-priming*), contrarrestando esa evasión [ver Tablas de estrategias RE y coestimulación]. En conjunto, integrar direccionamiento al RE + coestimulación nativa en membrana en un solo plásmido ofrece potencia inmunológica con simplicidad manufacturable.

Los cambios morfológicos que observamos con CD40L en RAW264.7, elongación, de protrusiones reticulares o dendriformes, son escasamente descritos en la literatura, pero encajan con un fenotipo de activación/maduración y, sobre todo, ofrecen un parámetro de lectura funcional, sencillo, reproducible y de bajo costo. Más allá del aspecto técnico, esta morfología sugiere aumento de superficie efectiva y de probabilidad de contacto célula–célula, con potencial para intensificar intercambio de señales y potenciar la secreción/recepción de citocinas y otras moléculas señalizadoras [242–244]. De forma coherente con trabajos en células dendríticas humanas activadas por CD40L [245], donde se han descrito redes de “nanotúbulos en túnel” (TNTs) reguladas por el entorno inflamatorio, es plausible que CD40L contribuya no solo a la coestimulación clásica, sino también a remodelar el citoesqueleto y la conectividad intercelular de tipo TNT, facilitando el reparto de antígenos y de contenido endosomal entre células presentadoras.

Estos cambios morfológicos documentados en el contexto de una vacuna de ADN y usando antígenos de VPH constituyen una primera aproximación; no obstante, si correspondieran a TNT, las implicaciones funcionales serían mayores. Los TNT son canales membranosos que conectan dos o más células, contienen F-actina y no tocan el sustrato; se han descrito en

epitelio, macrófagos y células dendríticas, incluso *in vivo*. Funcionalmente, pueden transferir entre células calcio, proteínas, miRNA, mitocondrias, vesículas (p. ej., lisosomas), patógenos y moléculas de superficie. En este marco, resultaría valioso determinar si la reticulación observada en nuestros ensayos corresponde a TNT verdaderos, porque ello implicaría un intercambio intercelular de antígenos y componentes de membrana con relevancia directa para la presentación y la cooperación entre APC en microambientes tisulares. Esto abre preguntas concretas: ¿CD40L puede compartirse célula a célula a través de TNT y potenciar la señalización coestimuladora en red? ¿Podrían complejos péptido:MHC-I transferirse o, al menos, facilitarse su “reparto” de antígeno procesado entre APC vecinas? De forma paralela, debe considerarse lo opuesto, es decir, si podrían estas estructuras representar una desventaja para la inducción de la respuesta inmunológica y el objetivo que se persigue [246–254]. En el contexto de infección y neoplasias inducidas por VPH, aún se desconoce si este tipo de remodelación morfológica y redes inducidas por CD40L están presentes. Tampoco se ha explorado su impacto en estrategias de inmunoterapia. La cuestión clave es determinar si dichas redes representarían una ventaja inmunológica, por ejemplo, al potenciar la producción de IL-12, facilitar la cooperación entre APC y aumentar la densidad de sinapsis inmunes, o, por el contrario, si podrían representar una desventaja. Nuestros datos morfológicos son compatibles con esta hipótesis de reticulación funcional; donde el demostrar TNT de manera formal (ensayos de imagen, marcadores de F-actina, ensayos de transferencia de carga/antígeno, bloqueo CD40–CD40L, citometría de MHC-I total y MHC-I:péptido, y ultraestructura) permitirían discriminar entre estos escenarios beneficiosos o adversos y orientar el diseño de vacunas que maximicen cooperación inmune.

Nuestro trabajo presenta varias limitaciones. Primero, aunque demostramos coexpresión y localización subcelular coherentes con el diseño (E7 en RE mediante PS/KDEL y CD40L en membrana), no cuantificamos directamente los complejos MHC-I:péptido específicos de E7 en superficie (p. ej., por multímeros o inmunopeptidómica), de modo que inferimos el beneficio sobre presentación a partir de marcadores de estrés del RE y de la lógica mecanística. Segundo, la bioactividad de CD40L se documentó por IL-12p70 y un fenotipo morfológico de activación en RAW264.7, pero no confirmamos la trimerización ni analizamos de manera biofísica la oligomerización en membrana; la funcionalidad sugiere trimerización, pero faltan pruebas directas. Tercero, las asignaciones subcelulares pueden reforzarse con colocalización sistemática frente a marcadores del RE (calnexina/calreticulina), cuantificación de tiempos de residencia y controles de permeabilización/fijación adicionales, ya que la detección de antígenos de membrana y luminales depende del protocolo (PFA frente a metanol/acetona/tritón). Cuarto, no desagregamos la contribución de pasos individuales del eje de procesamiento (p. ej., TAP, tapasina, ERAP, p97) mediante inhibidores o silenciamientos dirigidos; estos experimentos permitirían ligar causalmente estrés del RE/ERAD con aumento de carga en MHC-I (y explicar diferencias entre diseños luminales vs. con dominio de membrana. Finalmente, la traslación a escenarios dermatológicos requiere repetir en queratinocitos y en modelos *ex vivo* de piel; y aunque referimos datos clínicos históricos de CRT-E7 en HSIL/CIN2-3, nuestro estudio actual es preclínico y no incluye inmunogenicidad en humanos.

9. CONCLUSIÓN

Se diseñaron y caracterizaron vectores de expresión que codifican el antígeno tumoral E7, flanqueado por señales de envío y retención al retículo endoplásmico, así como CD40L, con el objetivo de mejorar la presentación antigénica y la activación inmune. Tras la transfección de células HEK293 con los vectores construidos, se confirmó la expresión de las proteínas E7 y CD40L. En estas células, CD40L mostró una localización predominantemente en la membrana plasmática, lo cual es consistente con su función biológica. Además, se observó que el vector que codifica CD40L fue capaz de inducir una respuesta biológica en células RAW264.7, indicando su funcionalidad en la activación de células del sistema inmune.

10. REFERENCIAS

1. Schiffman M, Castle PE (2005) The promise of global cervical-cancer prevention. *N Engl J Med* 353:2101–2104. <https://doi.org/10.1056/NEJMp058171>
2. Moody CA, Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10:550–560. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>
3. Abdulhaqq SA, Weiner DB (2008) DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. *Immunol Res* 42:219–232. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8076-3>
4. Trimble CL, Frazer IH (2009) Development of therapeutic HPV vaccines. *The Lancet Oncology* 10:975–980. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70227-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70227-X)
5. Heath WR, Carbone FR (2001) Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1:126–134. <https://doi.org/10.1038/35100512>
6. Cheng W-F, Hung C-F, Chai C-Y, et al (2001) Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J Clin Invest* 108:669–678
7. Yin R, Zheng W, Hao F, et al (2009) HPV16E7 tumor antigen modified by KDEL sequence induce specific cytotoxic T lymphocytes-dependent antitumor immunity. *J Dermatol Sci* 55:116–122. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.04.008>
8. Zhang L, Tang Y, Akbulut H, et al (2003) An adenoviral vector cancer vaccine that delivers a tumor-associated antigen/CD40-ligand fusion protein to dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:15101–15106. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135379100>
9. Wu J, Jin Q, Zhang Y, et al (2025) Global burden of cervical cancer: current estimates, temporal trend and future projections based on the GLOBOCAN 2022. *Journal of the National Cancer Center* 5:322–329. <https://doi.org/10.1016/j.jncc.2024.11.006>
10. Singh D, Vignat J, Lorenzoni V, et al (2023) Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative. *The Lancet Global Health* 11:e197–e206. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(22\)00501-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(22)00501-0)
11. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240014107>. Accessed 6 Sept 2025
12. Xu M, Cao C, Wu P, et al (2025) Advances in cervical cancer: current insights and future directions. *Cancer Communications* 45:77–109. <https://doi.org/10.1002/cac2.12629>

13. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L (2019) Cervical cancer. *The Lancet* 393:169–182. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
14. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard H-U, et al (2018) ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol* 99:989–990. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001105>
15. Ozbun MA, Campos SK (2021) The long and winding road: human papillomavirus entry and subcellular trafficking. *Current Opinion in Virology* 50:76–86. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.07.010>
16. Ryndock EJ, Conway MJ, Alam S, et al (2014) Roles for Human Papillomavirus Type 16 L1 Cysteine Residues 161, 229, and 379 in Genome Encapsidation and Capsid Stability. *PLOS ONE* 9:e99488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099488>
17. Molina MA, Steenbergen RDM, Pumpe A, et al (2024) HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait. *Trends in Molecular Medicine* 30:890–902. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2024.05.009>
18. Chang EY, Chen CH, Ji H, et al (2000) Antigen-specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogeneic tumor cell-based vaccine. *Int J Cancer* 86:725–730. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(20000601\)86:5%253C725::aid-ijc19%253E3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(20000601)86:5%253C725::aid-ijc19%253E3.0.co;2-k)
19. Roman A, Munger K (2013) The papillomavirus E7 proteins. *Virology* 445:138–168. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013>
20. Helt A-M, Galloway DA (2001) Destabilization of the Retinoblastoma Tumor Suppressor by Human Papillomavirus Type 16 E7 Is Not Sufficient To Overcome Cell Cycle Arrest in Human Keratinocytes. *Journal of Virology* 75:6737–6747. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.15.6737-6747.2001>
21. Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R (2006) Structure of the Human *Papillomavirus* E7 Oncoprotein and Its Mechanism for Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor*. *Journal of Biological Chemistry* 281:578–586. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508455200>
22. Chemes LB, Sánchez IE, Smal C, de Prat-Gay G (2010) Targeting mechanism of the retinoblastoma tumor suppressor by a prototypical viral oncoprotein. *The FEBS Journal* 277:973–988. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07540.x>
23. García-Alai MM, Alonso LG, de Prat-Gay G (2007) The N-Terminal Module of HPV16 E7 Is an Intrinsically Disordered Domain That Confers Conformational and Recognition Plasticity to the Oncoprotein. *Biochemistry* 46:10405–10412. <https://doi.org/10.1021/bi7007917>
24. Bodily JM, Mehta KPM, Cruz L, et al (2011) The E7 Open Reading Frame Acts in cis and in trans To Mediate Differentiation-Dependent Activities in the Human

- Papillomavirus Type 16 Life Cycle. *Journal of Virology* 85:8852–8862. <https://doi.org/10.1128/jvi.00664-11>
25. Stanley MA (2012) Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews* 25:215–222. <https://doi.org/10.1128/cmr.05028-11>
 26. Vine EE, Austin PJ, O’Neil TR, et al (2024) Epithelial dendritic cells vs. Langerhans cells: Implications for mucosal vaccines. *Cell Reports* 43:113977. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113977>
 27. Bosma DMT, Busselaar J, Staal MD, et al (2025) CD4+ T-cell help delivery to monocyte-derived dendritic cells promotes effector differentiation of helper and cytotoxic T cells. *Immunology Letters* 275:107022. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2025.107022>
 28. Dai W, Gui L, Du H, et al (2022) The association of cervicovaginal Langerhans cells with clearance of human papillomavirus. *Front Immunol* 13:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.918190>
 29. Fahey LM, Raff AB, Da Silva DM, Kast WM (2009) Reversal of human papillomavirus-specific T cell immune suppression through TLR agonist treatment of Langerhans cells exposed to human papillomavirus type 16. *J Immunol* 182:2919–2928. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803645>
 30. Yan L, Woodham AW, Da Silva DM, Kast WM (2015) Functional Analysis of HPV-Like Particle-Activated Langerhans Cells In Vitro. In: Keppler D, Lin AW (eds) *Cervical Cancer: Methods and Protocols*. Springer, New York, NY, pp 333–350
 31. Kiamba EW, Goodier MR, Clarke E (2025) Immune responses to human papillomavirus infection and vaccination. *Front Immunol* 16:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1591297>
 32. Fonseca DO da, Puga MAM, Gubert VT, et al (2025) Cellular Immune Response to High-Risk Human Papillomavirus Infection: A Systematic Review. *CRI* 45:. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2025057517>
 33. Miyauchi S, Kim SS, Jones RN, et al (2023) Human papillomavirus E5 suppresses immunity via inhibition of the immunoproteasome and STING pathway. *Cell Reports* 42:112508. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112508>
 34. Scott ML, Woodby BL, Ulicny J, et al (2020) Human Papillomavirus 16 E5 Inhibits Interferon Signaling and Supports Episomal Viral Maintenance. *Journal of Virology* 94:10.1128/jvi.01582-19. <https://doi.org/10.1128/jvi.01582-19>
 35. Gruener M, Bravo IG, Momburg F, et al (2007) The E5 protein of the human papillomavirus type 16 down-regulates HLA-I surface expression in calnexin-

- expressing but not in calnexin-deficient cells. *Virology Journal* 4:116. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-116>
36. Miura S, Kawana K, Schust DJ, et al (2010) CD1d, a Sentinel Molecule Bridging Innate and Adaptive Immunity, Is Downregulated by the Human Papillomavirus (HPV) E5 Protein: a Possible Mechanism for Immune Evasion by HPV. *Journal of Virology* 84:11614–11623. <https://doi.org/10.1128/jvi.01053-10>
 37. Lo Cigno I, Calati F, Girone C, et al (2024) High-risk HPV oncoproteins E6 and E7 and their interplay with the innate immune response: Uncovering mechanisms of immune evasion and therapeutic prospects. *Journal of Medical Virology* 96:e29685. <https://doi.org/10.1002/jmv.29685>
 38. Poirson J, Suarez IP, Straub M-L, et al (2022) High-Risk Mucosal Human Papillomavirus 16 (HPV16) E6 Protein and Cutaneous HPV5 and HPV8 E6 Proteins Employ Distinct Strategies To Interfere with Interferon Regulatory Factor 3-Mediated Beta Interferon Expression. *Journal of Virology* 96:e01875-21. <https://doi.org/10.1128/jvi.01875-21>
 39. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA (2009) Papillomavirus E6 proteins. *Virology* 384:324–334. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.017>
 40. Reiser J, Hurst J, Voges M, et al (2011) High-Risk Human Papillomaviruses Repress Constitutive Kappa Interferon Transcription via E6 To Prevent Pathogen Recognition Receptor and Antiviral-Gene Expression. *Journal of Virology* 85:11372–11380. <https://doi.org/10.1128/jvi.05279-11>
 41. Richards KH, Wasson CW, Watherston O, et al (2015) The human papillomavirus (HPV) E7 protein antagonises an Imiquimod-induced inflammatory pathway in primary human keratinocytes. *Sci Rep* 5:12922. <https://doi.org/10.1038/srep12922>
 42. Basukala O, Banks L (2021) The Not-So-Good, the Bad and the Ugly: HPV E5, E6 and E7 Oncoproteins in the Orchestration of Carcinogenesis. *Viruses* 13:1892. <https://doi.org/10.3390/v13101892>
 43. Kuo P, Teoh SM, Tuong ZK, et al (2018) Recruitment of Antigen Presenting Cells to Skin Draining Lymph Node From HPV16E7-Expressing Skin Requires E7-Rb Interaction. *Front Immunol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02896>
 44. Lou M, Huang D, Zhou Z, et al (2023) DNA virus oncoprotein HPV18 E7 selectively antagonizes cGAS-STING-triggered innate immune activation. *Journal of Medical Virology* 95:e28310. <https://doi.org/10.1002/jmv.28310>
 45. Westrich JA, Vermeer DW, Silva A, et al (2019) CXCL14 suppresses human papillomavirus-associated head and neck cancer through antigen-specific CD8+ T-cell responses by upregulating MHC-I expression. *Oncogene* 38:7166–7180. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0911-6>

46. Tummers B, Goedemans R, Jha V, et al (2014) CD40-Mediated Amplification of Local Immunity by Epithelial Cells Is Impaired by HPV. *Journal of Investigative Dermatology* 134:2918–2927. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.262>
47. Altenburg A, Baldus SE, Smola H, et al (1999) CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma. *J Immunol* 162:4140–4147
48. Shimauchi T, Piguet V (2014) Manipulated Microenvironment in Human Papilloma Virus–Infected Epithelial Cells: Is the CD40–CD154 Pathway Beneficial for Host or Virus? *Journal of Investigative Dermatology* 134:2866–2868. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.357>
49. Manzo-Merino J, Lagunas-Martínez A, Contreras-Ochoa CO, et al (2018) The Human Papillomavirus (HPV) E6 Oncoprotein Regulates CD40 Expression via the AT-Hook Transcription Factor AKNA. *Cancers* 10:521. <https://doi.org/10.3390/cancers10120521>
50. Hill SC, Youde SJ, Man S, et al (2005) Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis. *J Immunol* 174:41–50. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.41>
51. Moschonas A, Kouraki M, Knox PG, et al (2008) CD40 induces antigen transporter and immunoproteasome gene expression in carcinomas via the coordinated action of NF-kappaB and of NF-kappaB-mediated de novo synthesis of IRF-1. *Mol Cell Biol* 28:6208–6222. <https://doi.org/10.1128/MCB.00611-08>
52. Ritz U, Seliger B (2001) The Transporter Associated With Antigen Processing (TAP): Structural Integrity, Expression, Function, and Its Clinical Relevance. *Mol Med* 7:149–158. <https://doi.org/10.1007/BF03401948>
53. Zhang J, Burn C, Young K, et al (2018) Microparticles produced by human papillomavirus type 16 E7-expressing cells impair antigen presenting cell function and the cytotoxic T cell response. *Sci Rep* 8:2373. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20779-2>
54. Li J, Gao H-Q, Zhao C-L, et al (2004) [Dendritic cells present particulate E7 protein of human papillomavirus and induce strong immunity]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 84:932–936
55. Dachs GU, Dougherty GJ, Stratford IJ, Chaplin DJ (1997) Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res* 9:313–325
56. Yen M-C, Lai M-D (2013) Biolistic DNA Delivery to Mice with the Low Pressure Gene Gun. In: Sudowe S, Reske-Kunz AB (eds) *Biolistic DNA Delivery: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 169–174

57. Aravindaram K, Yin S-Y, Yang N-S (2013) Biolistic Transfection of Tumor Tissue Samples. In: Sudowe S, Reske-Kunz AB (eds) Biolistic DNA Delivery: Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, pp 133–143
58. Steitz J, Tüting T (2013) Biolistic DNA Vaccination Against Melanoma. In: Sudowe S, Reske-Kunz AB (eds) Biolistic DNA Delivery: Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, pp 317–337
59. Tang J, Li M, Zhao C, et al (2022) Therapeutic DNA Vaccines against HPV-Related Malignancies: Promising Leads from Clinical Trials. *Viruses* 14:239. <https://doi.org/10.3390/v14020239>
60. Akhatova A, Chan CK, Azizan A, Aimagambetova G (2022) The Efficacy of Therapeutic DNA Vaccines Expressing the Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins for Treatment of Cervical Cancer: Systematic Review. *Vaccines* 10:53. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010053>
61. Skolnik JM, Morrow MP (2023) Vaccines for HPV-associated diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 94:101224. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2023.101224>
62. Cheng MA, Farmer E, Huang C, et al (2018) Therapeutic DNA Vaccines for Human Papillomavirus and Associated Diseases. *Human Gene Therapy* 29:971–996. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.197>
63. Peng S, Ji H, Trimble C, et al (2004) Development of a DNA vaccine targeting human papillomavirus type 16 oncoprotein E6. *J Virol* 78:8468–8476. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.16.8468-8476.2004>
64. Diniz MO, Cariri FAMO, Aps LRMM, Ferreira LCS (2013) Enhanced Therapeutic Effects Conferred by an Experimental DNA Vaccine Targeting Human Papillomavirus-Induced Tumors. *Human Gene Therapy* 24:861–870. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.102>
65. Lescaille G, Pitoiset F, Macedo R, et al (2013) Efficacy of DNA Vaccines Forming E7 Recombinant Retroviral Virus-Like Particles for the Treatment of Human Papillomavirus-Induced Cancers. *Human Gene Therapy* 24:533–544. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.037>
66. Eusébio D, Almeida AM, Alves JM, et al (2021) The Performance of Minicircle DNA Versus Parental Plasmid in p53 Gene Delivery Into HPV-18-Infected Cervical Cancer Cells. *Nucleic Acid Therapeutics* 31:82–91. <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0904>
67. Peng S, Ferrall L, Gaillard S, et al (2021) Development of DNA Vaccine Targeting E6 and E7 Proteins of Human Papillomavirus 16 (HPV16) and HPV18 for Immunotherapy in Combination with Recombinant Vaccinia Boost and PD-1 Antibody. *mBio* 12:10.1128/mbio.03224-20. <https://doi.org/10.1128/mbio.03224-20>

68. Tang T, Cheng X, Truong B, et al (2021) Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint. *Pharmacology & Therapeutics* 219:107709. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107709>
69. Ramos da Silva J, Bitencourt Rodrigues K, Formoso Pelegrin G, et al (2023) Single immunizations of self-amplifying or non-replicating mRNA-LNP vaccines control HPV-associated tumors in mice. *Science Translational Medicine* 15:eabn3464. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abn3464>
70. Zhou K, Yuzhakov O, Behloul N, et al (2023) HPV16 E6/E7 -based mRNA vaccine is therapeutic in mice bearing aggressive HPV-positive lesions. *Front Immunol* 14:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1213285>
71. Peng S, Hou F, Yang X, et al (2025) Therapeutic mRNA vaccines targeting human papillomavirus type 16 E7 protein demonstrate significant antitumor efficacy in murine models of HPV-associated tumors. *International Journal of Pharmaceutics* 680:125785. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125785>
72. Wang J, Wang Q, Ma L, et al (2024) Development of an mRNA-based therapeutic vaccine mHTV-03E2 for high-risk HPV-related malignancies. *Molecular Therapy* 32:2340–2356. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2024.04.036>
73. He S, Niu H, Zhang L, et al (2024) Synergy Effects of HPV E6-E7 Encoding mRNA and Nucleic Acid Immunostimulators Improve Therapeutic Potential in TC-1 Graft Tumor. *Journal of Medical Virology* 96:e70075. <https://doi.org/10.1002/jmv.70075>
74. Khan S, Oosterhuis K, Wunderlich K, et al (2017) Development of a replication-deficient adenoviral vector-based vaccine candidate for the interception of HPV16- and HPV18-induced infections and disease. *International Journal of Cancer* 141:393–404. <https://doi.org/10.1002/ijc.30679>
75. Ghanaat M, Goradel NH, Arashkia A, et al (2021) Virus against virus: strategies for using adenovirus vectors in the treatment of HPV-induced cervical cancer. *Acta Pharmacol Sin* 42:1981–1990. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00616-5>
76. Akhatova A, Chan CK, Azizan A, Aimagambetova G (2021) The Efficacy of Therapeutic DNA Vaccines Expressing the Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins for Treatment of Cervical Cancer: Systematic Review. *Vaccines (Basel)* 10:53. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010053>
77. Chand Dakal T, Dhabhai B, Agarwal D, et al (2020) Mechanistic basis of co-stimulatory CD40-CD40L ligation mediated regulation of immune responses in cancer and autoimmune disorders. *Immunobiology* 225:151899. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.151899>
78. Piechutta M, Berghoff AS (2019) New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of Cluster of Differentiation 40 (CD40/TNFR5). *ESMO Open* 4:e000510. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000510>

79. McVey JC, Beatty GL (2025) Facts and Hopes of CD40 Agonists in Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 31:2079–2087. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-24-1660>
80. Djureinovic D, Wang M, Kluger HM (2021) Agonistic CD40 Antibodies in Cancer Treatment. *Cancers* 13:1302. <https://doi.org/10.3390/cancers13061302>
81. Vonderheide RH (2020) CD40 Agonist Antibodies in Cancer Immunotherapy. *Annual Review of Medicine* 71:47–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062518-045435>
82. Enell Smith K, Deric A, Hägerbrand K, et al (2021) Rationale and clinical development of CD40 agonistic antibodies for cancer immunotherapy. *Expert Opinion on Biological Therapy* 21:1635–1646. <https://doi.org/10.1080/14712598.2021.1934446>
83. Yin W, Duluc D, Joo H, et al (2016) Therapeutic HPV Cancer Vaccine Targeted to CD40 Elicits Effective CD8+ T-cell Immunity. *Cancer Immunol Res* 4:823–834. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0128>
84. Zhang L, Tang Y, Akbulut H, et al (2003) An adenoviral vector cancer vaccine that delivers a tumor-associated antigen/CD40-ligand fusion protein to dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:15101–15106. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135379100>
85. Zhang Y, Wang N, Ding M, et al (2020) CD40 Accelerates the Antigen-Specific Stem-Like Memory CD8+ T Cells Formation and Human Papilloma Virus (HPV)-Positive Tumor Eradication. *Front Immunol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01012>
86. Morrison AH, Diamond MS, Hay CA, et al (2020) Sufficiency of CD40 activation and immune checkpoint blockade for T cell priming and tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117:8022–8031. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918971117>
87. Vogt A, Sadeghlar F, Ayub TH, et al (2021) Alpha-Fetoprotein- and CD40Ligand-Expressing Dendritic Cells for Immunotherapy of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* 13:3375. <https://doi.org/10.3390/cancers13133375>
88. Feng J, Liu Y, Zhuang N, et al (2023) EDA-E7 Activated DCs Induces Cytotoxic T Lymphocyte Immune Responses against HPV Expressing Cervical Cancer in Human Setting. *Vaccines* 11:320. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020320>
89. Kim T-Y, Myoung H-J, Kim J-H, et al (2002) Both E7 and CpG-Oligodeoxynucleotide Are Required for Protective Immunity against Challenge with Human Papillomavirus 16 (E6/E7) Immortalized Tumor Cells Involvement of CD4+ and CD8+ T Cells in Protection. *Cancer Res* 62:7234–7240
90. Kim T-G, Kim C-H, Won EH, et al (2004) CpG-ODN-stimulated dendritic cells act as a potent adjuvant for E7 protein delivery to induce antigen-specific antitumour

immunity in a HPV 16 E7-associated animal tumour model. *Immunology* 112:117–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01851.x>

91. Labiano S, Roh V, Godfroid C, et al (2021) CD40 Agonist Targeted to Fibroblast Activation Protein α Synergizes with Radiotherapy in Murine HPV-Positive Head and Neck Tumors. *Clin Cancer Res* 27:4054–4065. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4717>
92. Hillemanns P, Denecke A, Woelber L, et al (2022) A Therapeutic Antigen-Presenting Cell-Targeting DNA Vaccine VB10.16 in HPV16-Positive High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia: Results from a Phase I/IIa Trial. *Clin Cancer Res* 28:4885–4892. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-1927>
93. Gonçalves CA, Pereira-da-Silva G, Silveira RCCP, et al (2024) Safety, Efficacy, and Immunogenicity of Therapeutic Vaccines for Patients with High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN 2/3) Associated with Human Papillomavirus: A Systematic Review. *Cancers* 16:672. <https://doi.org/10.3390/cancers16030672>
94. Han X, Gao Z, Cheng Y, et al (2023) A Therapeutic DNA Vaccine Targeting HPV16 E7 in Combination with Anti-PD-1/PD-L1 Enhanced Tumor Regression and Cytotoxic Immune Responses. *International Journal of Molecular Sciences* 24:15469. <https://doi.org/10.3390/ijms242015469>
95. Inovio Pharmaceuticals (2024) A Prospective, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 3 Study of VGX-3100 Delivered Intramuscularly Followed by Electroporation With CELLECTRA™ 5PSP for the Treatment of HPV-16 and/or HPV-18 Related High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) of the Cervix. clinicaltrials.gov
96. Inovio Pharmaceuticals (2023) A Phase 2, Open Label, Study of VGX-3100 Delivered Intramuscularly (IM) Followed by Electroporation (EP) for the Treatment of HPV-16 and/or HPV-18 Related Anal or Anal/Peri-Anal, High Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL), (AIN2, AIN3, PAIN2, PAIN3) in Individuals That Are Seronegative for Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1/2. clinicaltrials.gov
97. AIDS Malignancy Consortium (2025) A Phase 2 Evaluation of VGX-3100, a Synthetic DNA Immunotherapy Targeting Human Papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 Proteins, for Anal High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions (HSIL) in HIV-Positive Individuals. clinicaltrials.gov
98. Inovio Pharmaceuticals (2021) Prospective Study of HPV Specific Immunotherapy in Subjects With HPV Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCCa). clinicaltrials.gov
99. M.D. Anderson Cancer Center (2024) A Phase 2, Open-Label Study to Evaluate Efficacy of Combination Treatment With MEDI0457 (INO-3112) and Durvalumab (MEDI4736) in Patients With Recurrent/Metastatic Human Papilloma Virus Associated Cancers. clinicaltrials.gov

100. MedImmune LLC (2022) A Phase 1b/2a, Multi-Center Open-Label Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Combination Treatment With MEDI0457 (INO-3112) and Durvalumab (MEDI4736) in Patients With Recurrent/Metastatic HPV Associated Head and Neck Squamous Cancer. clinicaltrials.gov
101. Genexine, Inc. (2017) A Randomized, Open-label, Multi-center, Phase 2 Clinical Trial to Determine the Optimal Dose and Evaluate the Safety of GX-188E, a DNA-based Therapeutic Vaccine, Administered Intramuscularly by Electroporation (EP) in HPV Type 16 and/or 18 Positive Patients With Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 (CIN 3). clinicaltrials.gov
102. Genexine, Inc. (2017) A Prospective, Observational, Open-label, Multi-center, Follow-up Clinical Study to Determine Recurrence of Cervical Intraepithelial Neoplasia and Evaluate the Long-term Safety of GX-188E, a DNA-based Therapeutic Vaccine, Administered Intramuscularly by Electroporation (EP) in Subjects Who Were Diagnosed With HPV(Human Papillomavirus) 16 or 18 Positive Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 (CIN 3) and Participated in Phase 2 Trial (GX-188E_CIN3_P2). clinicaltrials.gov
103. Genexine, Inc. (2025) A Multi-Center, Open-label Phase Ib-II Trial of the Combination of GX-188E Vaccination and Pembrolizumab in Patients With Advanced, Non-Resectable HPV Type 16 and/or 18 Positive Cervical Cancer. clinicaltrials.gov
104. Park J (2017) A Randomized, Open-label Study to Evaluate the Safety and Efficacy of GX-188E, a DNA Therapeutic Vaccine Administered Intramuscularly by Electroporation, With GX-I7 Intravaginal Application or Imiquimod Topical Application in HPV16 and/or 18 Positive Patients With CIN3. clinicaltrials.gov
105. Genexine, Inc. (2014) A Single Center, Open-label, Dose-escalating, Phase I Study to Evaluate the Safety of GX-188E Administered by Electroporation (EP) in DNA-based Therapeutic Vaccine for Patients With Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 (CIN 3). clinicaltrials.gov
106. Nykode Therapeutics ASA (2022) An Exploratory Safety and Immunogenicity Study of Human Papillomavirus (HPV16+) Immunotherapy VB10.16 in Women With High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (HSIL; CIN 2/3). clinicaltrials.gov
107. Nykode Therapeutics ASA (2024) A Phase 1/2a, Open-label, Dose-finding Trial to Evaluate Safety, Immunogenicity, and Anti-tumor Activity of VB10.16 and Pembrolizumab in Patients with Unresectable Recurrent or Metastatic HPV16-positive Head-Neck Squamous Cell Carcinoma. clinicaltrials.gov
108. Nykode Therapeutics ASA (2024) A Two-Arm Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Selection Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of VB10.16 Alone or in Combination With Atezolizumab in Patients With HPV16-Positive, PD-L1-positive, Recurrent or Metastatic Cervical Cancer Who Are Refractory to

Pembrolizumab With Chemotherapy With/Without Bevacizumab.
clinicaltrials.gov

109. Nykode Therapeutics ASA (2023) A Multi-Centre, Open-label Phase 2a Trial of the Combination of VB10.16 and Atezolizumab in Patients With Advanced or Recurrent, Non-resectable HPV 16-Positive Cervical Cancer. clinicaltrials.gov
110. Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins (2018) A Phase I Clinical Trial Assessing the Safety and Feasibility of Administration of pNGVL4a-CRT/E7(Detox) DNA Vaccine Using the Intramuscular TriGrid™ Delivery System in Combination With Cyclophosphamide in HPV-16 Associated Head and Neck Cancer Patients. clinicaltrials.gov
111. Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins (2025) A Phase I Open Label, Dose Escalation Clinical Trial Assessing the Safety, Tolerability, and Feasibility of pNGVL4aCRTE6E7L2 HPV DNA Vaccine Administration Via Intramuscular TriGrid™ Electroporation Delivery System to Patients With HPV16-Positive High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. clinicaltrials.gov
112. Eisai Inc. (2013) A Multi-Center, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study of Amolimogene (ZYC101a) in the Treatment of High-Grade Cervical Intraepithelial Lesions (CIN 2/3) of the Uterine Cervix. clinicaltrials.gov
113. Yewdell JW (2001) Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends in Cell Biology* 11:294–297. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02030-X](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02030-X)
114. Loera-Arias MJ, Martínez-Pérez AG, Barrera-Hernández A, et al (2010) Targeting and retention of HPV16 E7 to the endoplasmic reticulum enhances immune tumour protection. *J Cell Mol Med* 14:890–894. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00934.x>
115. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11:823–836. <https://doi.org/10.1038/nri3084>
116. Singh R, Kaur N, Choubey V, et al (2024) Endoplasmic reticulum stress and its role in various neurodegenerative diseases. *Brain Res* 1826:148742. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148742>
117. Kettel P, Karagöz GE (2024) Endoplasmic reticulum: Monitoring and maintaining protein and membrane homeostasis in the endoplasmic reticulum by the unfolded protein response. *Int J Biochem Cell Biol* 172:106598. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2024.106598>
118. Moreews M, Karlsson MCI (2025) Endoplasmic reticulum stress: A key player in immune cell regulation and autoimmune disorders. *Semin Immunol* 78:101954. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2025.101954>

119. Benyair R, Ron E, Lederkremer GZ (2011) Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum. *Int Rev Cell Mol Biol* 292:197–280. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386033-0.00005-0>
120. Wang Q, Groenendyk J, Michalak M (2015) Glycoprotein Quality Control and Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecules* 20:13689–13704. <https://doi.org/10.3390/molecules200813689>
121. Sun Z, Brodsky JL (2019) Protein quality control in the secretory pathway. *J Cell Biol* 218:3171–3187. <https://doi.org/10.1083/jcb.201906047>
122. Vincenz-Donnelly L, Hipp MS (2017) The endoplasmic reticulum: A hub of protein quality control in health and disease. *Free Radic Biol Med* 108:383–393. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.031>
123. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD (2011) A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and Bioengineering* 108:2777–2793. <https://doi.org/10.1002/bit.23282>
124. Wiseman RL, Mesgarzadeh JS, Hendershot LM (2022) Reshaping endoplasmic reticulum quality control through the unfolded protein response. *Mol Cell* 82:1477–1491. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.03.025>
125. Wu SA, Li ZJ, Qi L (2025) Endoplasmic reticulum (ER) protein degradation by ER-associated degradation and ER-phagy. *Trends in Cell Biology* 35:576–591. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2025.01.002>
126. Hiramatsu N, Chiang W-C, Kurt TD, et al (2015) Multiple Mechanisms of Unfolded Protein Response-Induced Cell Death. *Am J Pathol* 185:1800–1808. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.009>
127. Austin RC (2009) The unfolded protein response in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 11:2279–2287. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2686>
128. Korennykh A, Walter P (2012) Structural basis of the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:251–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155826>
129. Preissler S, Ron D (2019) Early Events in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11:a033894. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033894>
130. Christianson JC, Jarosch E, Sommer T (2023) Mechanisms of substrate processing during ER-associated protein degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 24:777–796. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00633-8>

131. Carvalho P, Goder V, Rapoport TA (2006) Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* 126:361–373. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.043>
132. Habeck G, Ebner FA, Shimada-Kreft H, Kreft SG (2015) The yeast ERAD-C ubiquitin ligase Doa10 recognizes an intramembrane degron. *J Cell Biol* 209:261–273. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408088>
133. Bernasconi R, Galli C, Calanca V, et al (2010) Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates. *J Cell Biol* 188:223–235. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910042>
134. Krshnan L, van de Weijer ML, Carvalho P (2022) Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 14:a041247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041247>
135. Ballar P, Pabuccuoglu A, Kose FA (2011) Different p97/VCP complexes function in retrotranslocation step of mammalian ER-associated degradation (ERAD). *Int J Biochem Cell Biol* 43:613–621. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.12.021>
136. Xie W, Ng DTW (2010) ERAD substrate recognition in budding yeast. *Semin Cell Dev Biol* 21:533–539. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.02.007>
137. Shi J, Hu X, Guo Y, et al (2019) A technique for delineating the unfolding requirements for substrate entry into retrotranslocons during endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* 294:20084–20096. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010019>
138. Okumura M, Noi K, Inaba K (2021) Visualization of structural dynamics of protein disulfide isomerase enzymes in catalysis of oxidative folding and reductive unfolding. *Curr Opin Struct Biol* 66:49–57. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.10.004>
139. Okumura M, Kadokura H, Inaba K (2015) Structures and functions of protein disulfide isomerase family members involved in proteostasis in the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med* 83:314–322. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.010>
140. Medraño-Fernandez I, Fagioli C, Mezghrani A, et al (2014) Different redox sensitivity of endoplasmic reticulum associated degradation clients suggests a novel role for disulphide bonds in secretory proteins. *Biochem Cell Biol* 92:113–118. <https://doi.org/10.1139/bcb-2013-0090>
141. Bhamidipati A, Denic V, Quan EM, Weissman JS (2005) Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen. *Mol Cell* 19:741–751. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.07.027>

142. Soetandyo N, Wang Q, Ye Y, Li L (2010) Role of intramembrane charged residues in the quality control of unassembled T-cell receptor α -chains at the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 123:1031–1038. <https://doi.org/10.1242/jcs.059758>
143. Okuda-Shimizu Y, Hendershot LM (2007) Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Mol Cell* 28:544–554. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.012>
144. Lee S-O, Cho K, Cho S, et al (2010) Protein disulphide isomerase is required for signal peptide peptidase-mediated protein degradation. *EMBO J* 29:363–375. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.359>
145. Bernardi KM, Forster ML, Lencer WI, Tsai B (2008) Derlin-1 Facilitates the Retro-Translocation of Cholera Toxin. *Mol Biol Cell* 19:877–884. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-08-0755>
146. Hagiwara M, Nagata K (2012) Redox-dependent protein quality control in the endoplasmic reticulum: folding to degradation. *Antioxid Redox Signal* 16:1119–1128. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4495>
147. Hagiwara M, Maegawa K-I, Suzuki M, et al (2011) Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. *Mol Cell* 41:432–444. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.01.021>
148. Cai X, Ito S, Noi K, et al (2023) Mechanistic characterization of disulfide bond reduction of an ERAD substrate mediated by cooperation between ERdj5 and BiP. *J Biol Chem* 299:105274. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105274>
149. Oka OBV, Pringle MA, Schopp IM, et al (2013) ERdj5 is the ER reductase that catalyzes the removal of non-native disulfides and correct folding of the LDL receptor. *Mol Cell* 50:793–804. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.014>
150. Ushioda R, Hoseki J, Araki K, et al (2008) ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science* 321:569–572. <https://doi.org/10.1126/science.1159293>
151. Wahlman J, DeMartino GN, Skach WR, et al (2007) Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system. *Cell* 129:943–955. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.046>
152. Huyer G, Piluek WF, Fansler Z, et al (2004) Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem* 279:38369–38378. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402468200>
153. Walter J, Urban J, Volkwein C, Sommer T (2001) Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J* 20:3124–3131. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.12.3124>

154. Garza RM, Sato BK, Hampton RY (2009) *In Vitro* Analysis of Hrd1p-mediated Retrotranslocation of Its Multispanning Membrane Substrate 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA Reductase*. *Journal of Biological Chemistry* 284:14710–14722. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809607200>
155. Plemper RK, Böhmler S, Bordallo J, et al (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388:891–895. <https://doi.org/10.1038/42276>
156. Zhou M, Schekman R (1999) The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol Cell* 4:925–934. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80222-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80222-1)
157. Scott DC, Schekman R (2008) Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins. *J Cell Biol* 181:1095–1105. <https://doi.org/10.1083/jcb.200804053>
158. Walczak CP, Bernardi KM, Tsai B (2012) Endoplasmic reticulum-dependent redox reactions control endoplasmic reticulum-associated degradation and pathogen entry. *Antioxid Redox Signal* 16:809–818. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4425>
159. Michalek MT, Grant EP, Gramm C, et al (1993) A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 363:552–554. <https://doi.org/10.1038/363552a0>
160. Robinson PJ, Pringle MA, Fleming B, Bulleid NJ (2023) Distinct role of ERp57 and ERdj5 as a disulfide isomerase and reductase during ER protein folding. *J Cell Sci* 136:jcs260656. <https://doi.org/10.1242/jcs.260656>
161. Fan F, Zhang Q, Zhang Y, et al (2022) Two protein disulfide isomerase subgroups work synergistically in catalyzing oxidative protein folding. *Plant Physiol* 188:241–254. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab457>
162. Roelse J, Grommé M, Momburg F, et al (1994) Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. *J Exp Med* 180:1591–1597. <https://doi.org/10.1084/jem.180.5.1591>
163. Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S (1992) TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* 71:1205–1214. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(05\)80068-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80068-6)
164. Margulies DH, Jiang J, Ahmad J, et al (2023) Chaperone function in antigen presentation by MHC class I molecules—tapasin in the PLC and TAPBPR beyond. *Front Immunol* 14:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1179846>
165. Natarajan K, Jiang J, Margulies DH (2019) Structural aspects of chaperone-mediated peptide loading in the MHC-I antigen presentation pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 54:164–173. <https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1610352>

166. Cornel AM, Mimpfen IL, Nierkens S (2020) MHC Class I Downregulation in Cancer: Underlying Mechanisms and Potential Targets for Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 12:1760. <https://doi.org/10.3390/cancers12071760>
167. Gutiérrez-Martínez E, Planès R, Anselmi G, et al (2015) Cross-Presentation of Cell-Associated Antigens by MHC Class I in Dendritic Cell Subsets. *Front Immunol* 6:363. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00363>
168. Martínez-Puente DH, Pérez-Trujillo JJ, Gutiérrez-Puente Y, et al (2019) Targeting HPV-16 antigens to the endoplasmic reticulum induces an endoplasmic reticulum stress response. *Cell Stress Chaperones* 24:149–158. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0952-8>
169. Martínez-Puente DH, Garza-Morales R, Pérez-Trujillo JJ, et al (2021) Targeting E7 antigen to the endoplasmic reticulum degradation pathway promotes a potent therapeutic antitumor effect. *J Drug Target* 29:1102–1110. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2021.1919124>
170. Parodi AJ (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* 69:69–93. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.69>
171. Lederkremer GZ (2009) Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr Opin Struct Biol* 19:515–523. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.06.004>
172. Kozlov G, Gehring K (2020) Calnexin cycle - structural features of the ER chaperone system. *FEBS J* 287:4322–4340. <https://doi.org/10.1111/febs.15330>
173. Tannous A, Pisoni GB, Hebert DN, Molinari M (2015) N-linked sugar-regulated protein folding and quality control in the ER. *Semin Cell Dev Biol* 41:79–89. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.12.001>
174. Parodi AJ (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J* 348 Pt 1:1–13
175. Ruddock LW, Molinari M (2006) N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci* 119:4373–4380. <https://doi.org/10.1242/jcs.03225>
176. Lamriben L, Graham JB, Adams BM, Hebert DN (2016) N-glycan based ER molecular chaperone and protein quality control system: the calnexin binding cycle. *Traffic* 17:308–326. <https://doi.org/10.1111/tra.12358>
177. Matlack KE, Misselwitz B, Plath K, Rapoport TA (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97:553–564. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80767-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80767-9)

178. Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, et al (2001) A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2:415–422. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve084>
179. Mikami K, Yamaguchi D, Tateno H, et al (2010) The sugar-binding ability of human OS-9 and its involvement in ER-associated degradation. *Glycobiology* 20:310–321. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp175>
180. Oda Y, Hosokawa N, Wada I, Nagata K (2003) EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* 299:1394–1397. <https://doi.org/10.1126/science.1079181>
181. Molinari M, Calanca V, Galli C, et al (2003) Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* 299:1397–1400. <https://doi.org/10.1126/science.1079474>
182. Quan EM, Kamiya Y, Kamiya D, et al (2008) Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Cell* 32:870–877. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.017>
183. Clerc S, Hirsch C, Oggier DM, et al (2009) Htm1 protein generates the N-glycan signal for glycoprotein degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 184:159–172. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809198>
184. Szathmary R, Biemann R, Nita-Lazar M, et al (2005) Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD. *Mol Cell* 19:765–775. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.015>
185. Kim W, Spear ED, Ng DTW (2005) Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Mol Cell* 19:753–764. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.010>
186. Roth J, Zuber C (2017) Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of N-glycan handling, EDEM1 and OS-9. *Histochem Cell Biol* 147:269–284. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1513-9>
187. Määttänen P, Gehring K, Bergeron JJM, Thomas DY (2010) Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Semin Cell Dev Biol* 21:500–511. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.03.006>
188. Spear ED, Ng DTW (2005) Single, context-specific glycans can target misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *J Cell Biol* 169:73–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200411136>
189. Moremen KW, Molinari M (2006) N-linked glycan recognition and processing: the molecular basis of endoplasmic reticulum quality control. *Curr Opin Struct Biol* 16:592–599. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.08.005>

190. Akhatova A, Chan CK, Azizan A, Aimagambetova G (2022) The Efficacy of Therapeutic DNA Vaccines Expressing the Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins for Treatment of Cervical Cancer: Systematic Review. *Vaccines* 10:53. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010053>
191. Cheng W-F, Hung C-F, Chai C-Y, et al (2001) Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J Clin Invest* 108:669–678. <https://doi.org/10.1172/JCI12346>
192. Kim JW, Hung C-F, Juang J, et al (2004) Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Ther* 11:1011–1018. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302252>
193. Hsieh C-J, Kim TW, Hung C-F, et al (2004) Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. *Vaccine* 22:3993–4001. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.057>
194. Cheng W-F, Hung C-F, Chen C-A, et al (2005) Characterization of DNA vaccines encoding the domains of calreticulin for their ability to elicit tumor-specific immunity and antiangiogenesis. *Vaccine* 23:3864–3874. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.032>
195. Peng S, Tomson TT, Trimble C, et al (2006) A combination of DNA vaccines targeting human papillomavirus type 16 E6 and E7 generates potent antitumor effects. *Gene Ther* 13:257–265. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302646>
196. Cheng W-F, Chen L-K, Chen C-A, et al (2006) Chimeric DNA vaccine reverses morphine-induced immunosuppression and tumorigenesis. *Mol Ther* 13:203–210. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.06.479>
197. Gomez-Gutierrez JG, Elpek KG, Montes de Oca-Luna R, et al (2007) Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunol Immunother* 56:997–1007. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0247-2>
198. Kim D, Gambhira R, Karanam B, et al (2008) Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. *Vaccine* 26:351–360. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.11.019>
199. Peng S, Trimble C, Alvarez RD, et al (2008) Cluster intradermal DNA vaccination rapidly induces E7-specific CD8+ T-cell immune responses leading to therapeutic antitumor effects. *Gene Ther* 15:1156–1166. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.53>
200. Tseng C-W, Hung C-F, Alvarez RD, et al (2008) Pretreatment with Cisplatin Enhances E7-Specific CD8+ T-Cell-Mediated Antitumor Immunity Induced by DNA Vaccination. *Clin Cancer Res* 14:3185–3192. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0037>

201. Tseng C-W, Trimble C, Zeng Q, et al (2009) Low-dose radiation enhances therapeutic HPV DNA vaccination in tumor-bearing hosts. *Cancer Immunol Immunother* 58:737–748. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0596-0>
202. Grasso F, Negri DRM, Mochi S, et al (2013) Successful therapeutic vaccination with integrase defective lentiviral vector expressing nononcogenic human papillomavirus E7 protein. *Int J Cancer* 132:335–344. <https://doi.org/10.1002/ijc.27676>
203. Peng S, Lyford-Pike S, Akpeng B, et al (2013) Low-dose cyclophosphamide administered as daily or single dose enhances the antitumor effects of a therapeutic HPV vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 62:171–182. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1322-5>
204. Peng S, Song L, Knoff J, et al (2014) Control of HPV-associated tumors by innovative therapeutic HPV DNA vaccine in the absence of CD4+ T cells. *Cell Biosci* 4:11. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-11>
205. Lee S-J, Song L, Yang M-C, et al (2015) Local administration of granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces local accumulation of dendritic cells and antigen-specific CD8+ T cells and enhances dendritic cell cross-presentation. *Vaccine* 33:1549–1555. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.019>
206. Sun Y, Peng S, Qiu J, et al (2015) Intravaginal HPV DNA vaccination with electroporation induces local CD8+ T-cell immune responses and antitumor effects against cervicovaginal tumors. *Gene Ther* 22:528–535. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.17>
207. Alvarez RD, Huh WK, Bae S, et al (2016) A pilot study of pNGVL4a-CRT/E7(detox) for the treatment of patients with HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3 (CIN2/3). *Gynecol Oncol* 140:245–252. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.11.026>
208. Peng S, Mattox A, Best SR, et al (2016) Identification of the murine H-2Db and human HLA-A*0201 MHC class I-restricted HPV6 E7-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Cancer Immunol Immunother* 65:261–271. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1793-x>
209. Sun Y, Peng S, Yang A, et al (2017) Coinjection of IL2 DNA enhances E7-specific antitumor immunity elicited by intravaginal therapeutic HPV DNA vaccination with electroporation. *Gene Ther* 24:408–415. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.38>
210. Rosas-Taraco A, Villanueva-Olivo A, Saucedo-Cardenas O, et al (2010) Targeting and retention of antigen to the endoplasmic reticulum enhances immune tumor protection. In: HUMAN GENE THERAPY. MARY ANN LIEBERT INC 140 HUGUENOT STREET, 3RD FL, NEW ROCHELLE, NY 10801 USA, pp 1421–1421
211. Oosterhuis K, Aleyd E, Vrijland K, et al (2012) Rational design of DNA vaccines for the induction of human papillomavirus type 16 E6- and E7-specific cytotoxic T-cell responses. *Hum Gene Ther* 23:1301–1312. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.101>

212. Perez-Trujillo JJ, Garza-Morales R, Barron-Cantu JA, et al (2017) DNA vaccine encoding human papillomavirus antigens flanked by a signal peptide and a KDEL sequence induces a potent therapeutic antitumor effect. *Oncol Lett* 13:1569–1574. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5635>
213. Pérez-Trujillo JJ, Robles-Rodríguez OA, Garza-Morales R, et al (2018) Antitumor Response by Endoplasmic Reticulum-Targeting DNA Vaccine Is Improved by Adding a KDEL Retention Signal. *Nucleic Acid Ther* 28:252–261. <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0717>
214. Garza-Morales R, Perez-Trujillo JJ, Martinez-Jaramillo E, et al (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 (Basel)* 11:96. <https://doi.org/10.3390/cancers11010096>
215. Martinez-Perez AG, Perez-Trujillo JJ, Garza-Morales R, et al (2021) 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)* 9:149. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020149>
216. Martínez-Puente DH, Garza-Morales R, Pérez-Trujillo JJ, et al (2023) Enhanced antitumor activity induced by a DNA vaccine encoding E7 antigen fused to an ERAD-targeting sequence. *J Drug Target* 31:100–108. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2022.2107651>
217. Martínez-Puente DH, Garza-Morales R, Pérez-Trujillo JJ, et al (2021) Targeting E7 antigen to the endoplasmic reticulum degradation pathway promotes a potent therapeutic antitumor effect. *J Drug Target* 29:1102–1110. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2021.1919124>
218. Wilson JT (2025) Crucial meeting: molecule helps vaccine to interact with killer T cells. *Nature* 641:44–46. <https://doi.org/10.1038/d41586-025-00900-y>
219. Wang X, Huang Z, Xing L, et al (2025) STING agonist-based ER-targeting molecules boost antigen cross-presentation. *Nature* 641:202–210. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-08758-w>
220. Xu Y, Fang D (2020) Endoplasmic reticulum-associated degradation and beyond: The multitasking roles for HRD1 in immune regulation and autoimmunity. *J Autoimmun* 109:102423. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102423>
221. Qin X, Denton WD, Huiting LN, et al (2020) Unraveling the regulatory role of endoplasmic-reticulum-associated degradation in tumor immunity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 55:322–353. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1784085>
222. Cláudio N, Dalet A, Gatti E, Pierre P (2013) Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways. *EMBO J* 32:1214–1224. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.80>

223. Correa-Medero LO, Jankowski SE, Hong HS, et al (2024) ER-associated degradation adapter Sel1L is required for CD8+ T cell function and memory formation following acute viral infection. *Cell Rep* 43:114156. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114156>
224. Luo H, Sun Y, Wang L, et al (2023) Targeting endoplasmic reticulum associated degradation pathway combined with radiotherapy enhances the immunogenicity of esophageal cancer cells. *Cancer Biol Ther* 24:2166763. <https://doi.org/10.1080/15384047.2023.2166763>
225. Sun S, Shi G, Sha H, et al (2015) IRE1 α is an endogenous substrate of endoplasmic-reticulum-associated degradation. *Nat Cell Biol* 17:1546–1555. <https://doi.org/10.1038/ncb3266>
226. Lozano G, Francisco-Velilla R, Martinez-Salas E (2018) Deconstructing internal ribosome entry site elements: an update of structural motifs and functional divergences. *Open Biology* 8:180155. <https://doi.org/10.1098/rsob.180155>
227. Cheng W-F, Hung C-F, Chen C-A, et al (2005) Characterization of DNA vaccines encoding the domains of calreticulin for their ability to elicit tumor-specific immunity and antiangiogenesis. *Vaccine* 23:3864–3874. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.032>
228. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA (2019) GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci* 226:156–163. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.022>
229. Saxena RK, Vallyathan V, Lewis DM (2003) Evidence for lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic like cells. *J Biosci* 28:129–134. <https://doi.org/10.1007/BF02970143>
230. Houdebine LM, Attal J (1999) Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use. *Transgenic Res* 8:157–177. <https://doi.org/10.1023/a:1008909908180>
231. Zhao J, Li Y, Wang C, et al (2020) IRESbase: A Comprehensive Database of Experimentally Validated Internal Ribosome Entry Sites. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 18:129–139. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.03.001>
232. Reigadas S, Pacheco A, Ramajo J, et al (2005) Specific interference between two unrelated internal ribosome entry site elements impairs translation efficiency. *FEBS Lett* 579:6803–6808. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.11.015>
233. Cizkova K, Malohlava J, Tauber Z (2020) Cell Membrane Nanostructure is Altered by Heat-Induced Antigen Retrieval: A Possible Consequence for Immunocytochemical Detection of Membranous Antigens. *Microsc Microanal* 26:139–147. <https://doi.org/10.1017/S1431927619015113>
234. Jamur MC, Oliver C (2010) Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol* 588:63–66. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_9

235. Edechi CA, Amini M, Hamedani MK, et al (2022) Comparison of Fixation Methods for the Detection of Claudin 1 and E-Cadherin in Breast Cancer Cell Lines by Immunofluorescence. *J Histochem Cytochem* 70:181–187. <https://doi.org/10.1369/00221554211055240>
236. Goodarzi MM, Mosayebi G, Ganji A, et al (2024) HPV16 mutant E6/E7 construct is protective in mouse model. *BMC Biotechnology* 24:71. <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00893-y>
237. Qin H, Wilson CA, Lee SJ, et al (2005) LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF- κ B and STAT-1 α in macrophages and microglia. *Blood* 106:3114–3122. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0759>
238. Khan N, Rahim SS, Boddupalli CS, et al (2006) Hydrogen peroxide inhibits IL-12 p40 induction in macrophages by inhibiting c-rel translocation to the nucleus through activation of calmodulin protein. *Blood* 107:1513–1520. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1707>
239. Damdindorj L, Karnan S, Ota A, et al (2014) A comparative analysis of constitutive promoters located in adeno-associated viral vectors. *PLoS One* 9:e106472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106472>
240. Román R, Miret J, Scalia F, et al (2016) Enhancing heterologous protein expression and secretion in HEK293 cells by means of combination of CMV promoter and IFN α 2 signal peptide. *J Biotechnol* 239:57–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.005>
241. Xu T-T, Wang Y-F, Yuan J-J, et al (2025) Optimization of the intron sequences combined with the CMV promoter increases recombinant protein expression in CHO cells. *Sci Rep* 15:3732. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-87941-5>
242. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180:1263–1272. <https://doi.org/10.1084/jem.180.4.1263>
243. Saxena RK, Vallyathan V, Lewis DM (2003) Evidence for lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic like cells. *J Biosci* 28:129–134. <https://doi.org/10.1007/BF02970143>
244. Lee Y-N, Lee H-Y, Kang H-K, et al (2004) Phosphatidic acid positively regulates LPS-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 318:839–845. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.112>
245. Zaccard CR, Watkins SC, Kalinski P, et al (2015) CD40L induces functional tunneling nanotube networks exclusively in dendritic cells programmed by mediators of type-1 immunity. *J Immunol* 194:1047–1056. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401832>

246. Lv W, Li Z, Wang S, et al (2024) A role for tunneling nanotubes in virus spread. *Front Microbiol* 15:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1356415>
247. Tiwari V, Koganti R, Russell G, et al (2021) Role of Tunneling Nanotubes in Viral Infection, Neurodegenerative Disease, and Cancer. *Front Immunol* 12:680891. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.680891>
248. Lou E, Vérollet C, Winkler F, et al (2024) Tunneling nanotubes and tumor microtubes- Emerging data on their roles in intercellular communication and pathophysiology: Summary of an International FASEB Catalyst Conference October 2023. *FASEB J* 38:e23514. <https://doi.org/10.1096/fj.202302551>
249. Jansens RJJ, Tishchenko A, Favoreel HW (2020) Bridging the Gap: Virus Long-Distance Spread via Tunneling Nanotubes. *Journal of Virology* 94:10.1128/jvi.02120-19. <https://doi.org/10.1128/jvi.02120-19>
250. Valdebenito S, Malik S, Luu R, et al (2021) Tunneling nanotubes, TNT, communicate glioblastoma with surrounding non-tumor astrocytes to adapt them to hypoxic and metabolic tumor conditions. *Sci Rep* 11:14556. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93775-8>
251. Melwani PK, Pandey BN (2023) Tunneling nanotubes: The intercellular conduits contributing to cancer pathogenesis and its therapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1878:189028. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189028>
252. Chen M, Zhao D (2024) Invisible Bridges: Unveiling the Role and Prospects of Tunneling Nanotubes in Cancer Therapy. *Mol Pharmaceutics* 21:5413–5429. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.4c00563>
253. Mittal R, Karhu E, Wang J-S, et al (2019) Cell communication by tunneling nanotubes: Implications in disease and therapeutic applications. *J Cell Physiol* 234:1130–1146. <https://doi.org/10.1002/jcp.27072>
254. Lou E, O’Hare P, Subramanian S, Steer CJ (2017) Lost in translation: applying 2D intercellular communication via tunneling nanotubes in cell culture to physiologically relevant 3D microenvironments. *FEBS J* 284:699–707. <https://doi.org/10.1111/febs.13946>