

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL
DE VERSIONES MUTANTES DE LA PROTEÍNA E7 DEL HPV-16
FUSIONADAS A CALRETICULINA EN UN MODELO MURINO
MEDIANTE TERAPIA GÉNICA ADENOVIRAL”**

POR

Q.B.P. MARÍA DE JESÚS LOERA ARIAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
TERMINAL EN MORFOLOGÍA.**

FEBRERO 2010

**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE VERSIONES
MUTANTES DE LA PROTEÍNA E7 DEL HPV-16 FUSIONADAS A CALRETICULINA
EN UN MODELO MURINO MEDIANTE TERAPIA GÉNICA ADENOVIRAL”**

APROBACIÓN DE TESIS

**DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA.
DIRECTOR**

**DR. ARTURO CHÁVEZ REYES.
COMISIÓN DE TESIS**

**DRA. ODILA SAUCEDO CÁRDENAS.
COMISIÓN DE TESIS**

**DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA.
COMISIÓN DE TESIS**

**DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA.
COMISIÓN DE TESIS**

**DR. MED. DIONICIO ÁNGEL GALARZA DELGADO.
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

MONTERREY, NUEVO LEÓN

FEBRERO 2010

**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE VERSIONES
MUTANTES DE LA PROTEÍNA E7 DEL HPV-16 FUSIONADAS A CALRETICULINA
EN UN MODELO MURINO MEDIANTE TERAPIA GÉNICA ADENOVIRAL”**

Por

MARÍA DE JESÚS LOERA ARIAS

**El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Histología
de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección del Dr.**

Roberto Montes de Oca.

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

Monterrey, Nuevo León

Febrero 2010

*A las pacientes con cáncer que luchan,
un granito de arena en ese mar de batallas.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme en todo momento.

A Diego, por ser la alegría y el motor de mis días.

A Carlos Ortega, por su amor infinito.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por ser un gran ejemplo con la entrega total a su trabajo. Por su gran apoyo y las enseñanzas en todos estos años...

Al Dr. Arturo Chávez Reyes, por toda su ayuda y consejos para la realización de este trabajo, así como su compañerismo y excelente amistad.

A mi comisión de Tesis Dra. Odila Saucedo Cárdenas, Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza y al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por su asesoría y grandes aportes en cada una de sus especialidades a mi trabajo.

Al Dr. Adrián J. Rosas Taraco, al Dr. Jorge Gómez Gutiérrez, la Dra. Blanca Rangel Colmenero y al M.C. Daniel Cervantes por sus consejos para mejorar en las metodologías que se utilizaron en este trabajo.

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

A mis compañeros Julio Villatoro, Arnulfo Villanueva, Cecilia Esparza, Laura Zavala Deyanira Quistián, Humberto Rodríguez, Aracely García, Cristian Rodríguez, Marcos Guerrero, Daniel Díaz, Analí Gamez, Eduardo Franco, Miguel Parga, Sandra Flores, Carlos Mata, Natalia Martínez, Erika González, Yessica Lugo, Letty Elenes y los Adenoadeptus por todos los buenos momentos compartidos en el laboratorio y por ofrecerme su amistad.

A todos mis amigos y en especial a Tabitha Quiroz, Paola García, Nayelli Domínguez, Ofelia Sánchez, Ledy García y Lidia Melo por ser un gran apoyo cada día.

GRACIAS...

CONTENIDO TEMÁTICO

INTRODUCCIÓN	13
ANTECEDENTES	16
Cáncer Cérvico-uterino	16
Virus del Papiloma Humano	17
Transformación Celular	21
Gen E7 del HPV-16	23
Respuesta Inmune contra el HPV	24
Mecanismos de Evasión del Sistema Inmune	26
Desarrollo de vacunas contra el HPV	28
Uso de Vectores Adenovirales	29
Estado actual de las vacunas contra el cáncer cérvico-uterino	29
Uso de E7 como antígeno del HPV en la elaboración de vacunas	31
Mutaciones en el antígeno E7	33
Calreticulina como potenciador de la respuesta inmune	35
Nuevas versiones mutantes del antígeno E7	36
HIPÓTESIS	39
IMPACTO	39
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS PARTICULARES	40
DISEÑO EXPERIMENTAL	41
MATERIALES Y MÉTODOS	42

Construcción de las diferentes versiones del antígeno E7	42
• Construcción CRT/E7m	42
• Construcción CRT/E7dm	43
• Construcción SP/E7/KDEL	44
Obtención del genoma adenoviral	45
Obtención de partículas virales y producción a pequeña escala	46
Determinar la multiplicidad de infección de los adenovirus producidos	47
Tinción con X-Gal	48
Detección de las proteínas recombinantes	48
Detección de la localización celular de las proteínas recombinantes	50
Producción a gran escala y purificación de las partículas virales	51
Aislamiento de células de bazo	
Cuantificación de los niveles de liberación de IFN-γ de los linfocitos en cultivo	52
Análisis de la capacidad lítica de los linfocitos contra células que expresen E7	53
Ensayos de protección antitumoral	53
Análisis Estadístico	54
RESULTADOS	55
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	62
LITERATURA CITADA	83
APÉNDICE	93

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Virus del Papiloma Humano.	19
Figura 2. Estructura del genoma del HPV.	19
Figura 3. Estructura del antígeno E7.	25
Figura 4. Mecanismo de transformación de E7.	25
Figura 5. Construcciones CRT/E7dm y CRT/E7m.	38
Figura 6. Construcción SP/E7/KDEL.	38
Figura 7. Secuencia del gen CRT/E7m.	56
Figura 8. Construcción de la clona pShuttle: CRT/E7m.	56
Figura 9. Secuencia del gen CRT/E7dm.	57
Figura 10. Plásmido pShuttle: CRT/E7dm.	57
Figura 11. Recombinación homóloga para la obtención del genoma adenoviral.	59
Figura 12. Caracterización Adenovirus CRT/E7dm.	59
Figura 13. Efecto Citopático.	61
Figura14. Ensayo de MOI para HEK293.	61
Figura 15. Tinción de X-Gal para el Ad-LacZ.	63
Figura 16. Detección de las proteínas recombinantes.	63
Figura 17. Localización celular del marcador Calnexina.	65
Figura 18. Localización de las proteínas E7 mutantes fusionadas a Calreticulina.	65
Figura 19. Ensayo terapéutico.	67
Figura 20. Secuencia de la Fusión SP/E7/KDEL.	69
Figura 21. Caracterización del Adenovirus SP/E7/KDEL.	69
Figura 22. Efecto del inhibidor de proteosoma Calapin I.	69

Figura 23. Detección de la expresión de la proteína recombinante SP/E7/KDEL.	71
Figura 24. El antígeno SP/E7/KDEL es expresado en retículo endoplásmico.	71
Figura 25. Niveles de IFN gamma en cultivo de linfocitos inmunizados.	73
Figura 26. Ensayo de citotoxicidad.	73
Figura 27. Efecto antitumoral del Adenovirus SP/E7/KDEL.	75

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de los Adenovirus Purificados.	67
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
aa	Aminoácido
Ad	Adenovirus
ADN	Acido desoxirribonucleico
Aprox	Aproximadamente
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CaCu	Cáncer Cérvicouterino
CMV	Citomegalovirus
CPE	Efecto citopático (del inglés Cytopathic Effect)
CRT	Calreticulina
CTL	Linfocitos T Citotóxicos
DAPI	4',6-DiAmidina-2-FenilIndol
EDTA	Acido Etilen-Di-amino Treta-Acético
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
FBS	Suero Fetal Bovino
g	Gravedades
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés Green Fluorescent Protein)
HLA	Antígenos de Histocompatibilidad
HPV	Virus del Papiloma Humano
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés Horsedish Peroxidase)
i.p.	Intraperitoneal
IFN	Interferón
IL	Interleucina
Kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertoni
LDH	Lactato deshidrogenasa
mA	Miliamperes

MHCI	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de Infección
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanómetros
OD	Densidad óptica
ORI	Origen de replicación
P.V.	Partículas virales
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pRb	Proteína Retinoblastoma
PVDF	Polivinilidenofluoruro
RE	Retículo endoplásmico
SARS	Síndrome Agudo Respiratorio Severo
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
seg	Segundos
SP	Péptido señal
Tris	Trizma base
TSA	Antígeno Específico de Tumor
U	Unidades
VLPs	Partículas Similares a Virus (del inglés Virus-Like Particles)
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro

RESUMEN

Q.B.P. María de Jesús Loera Arias

Fecha de Graduación: Febrero 2010

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título: **Diseño y Evaluación de la Actividad Antitumoral de Versiones Mutantes de la Proteína E7 del HPV-16 Fusionadas a Calreticulina en un Modelo Murino Mediante Terapia Génica Adenoviral**

Número de páginas: 80

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

Área de Estudio: Morfología

Propósito y Método del Estudio. El cáncer cérvico-uterino (CaCu) está asociado al Virus del Papiloma Humano (HPV), especialmente el virus de alto riesgo oncogénico HPV-16, por lo que el control de la infección de este virus es de suma importancia. El objetivo de mi trabajo fue determinar si adenovirus que expresan la fusión de variantes mutantes de la proteína E7 del HPV-16 sin capacidad transformante fusionadas a Calreticulina (Ad-CRT/E7m y Ad-CRT/E7dm) poseen una mayor actividad antitumoral que el adenovirus que expresa el antígeno E7 silvestre fusionado a Calreticulina (Ad-CRT/E7). Para cumplir con nuestro objetivo se construyeron y caracterizaron los adenovirus que codifican para las proteínas de fusión y se estableció un modelo tumoral murino mediante la inoculación de células TC-1 que expresan el antígeno E7. Posteriormente se administraron los adenovirus en los ratones y se monitoreó el desarrollo del tumor en función del tiempo. Además, se realizaron estudios para medir la respuesta inmune celular, así como ensayos de inmunofluorescencia para determinar la localización celular de las proteínas recombinantes.

Contribuciones y Conclusiones. Con nuestros resultados se demuestra que el uso de la nueva versión doble mutante de E7 del HPV-16 fusionada a Calreticulina genera un mejor efecto antitumoral que la versión silvestre de la misma. Lo anterior tiene un gran impacto ya que estas mutaciones eliminan la capacidad transformante que posee el antígeno E7 y esto es primordial para poder generar una vacuna con potencial uso terapéutico en humanos sin el riesgo oncogénico. Así mismo, se demostró que la fusión de E7 a señales de envío y retención en retículo endoplásmico le confieren el mismo efecto antitumoral que al fusionar el antígeno a la proteína Calreticulina. Esto es importante si queremos simplificar el sistema mediante la inmunización con vacunas que contengan menos elementos exógenos. Con nuestros resultados podemos concluir que las versiones mutantes de E7 del HPV-16 fusionadas a Calreticulina potencian notablemente el efecto antitumoral del antígeno E7 silvestre y que la localización de antígenos al retículo endoplásmico resulta en un potente efecto antitumoral similar al de la fusión de este antígeno a Calreticulina.

Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Director de Tesis

ABSTRACT

Cervical cancer represents one of the biggest public health problems and is the second most common cause of death by cancer in woman worldwide. More than 99% of cervical cancers contain Human Papillomavirus (HPV), particularly the high-risk HPV type 16 (HPV-16) so the control of this virus is very important. The aim of this study was to determine whether an adenovirus that expresses the fusion of a mutant variant of the protein E7 of HPV-16 lacking its transforming ability fused to Calreticulin (Ad-CRT/E7dm) has a greater antitumor activity than the adenovirus that expresses Calreticulin fused to wild type E7 (Ad-CRT/E7). To meet our goal an adenovirus was built and characterized and a murine tumor model was established by inoculation of cells TC-1 expressing the E7 antigen. Subsequently the following treatments were applied to the mice, Ad-CRT/E7, Ad-CRT/E7dm, Ad-CRT/E7, Ad-E7 and Ad-LacZ and tumor development was measured. Moreover immunofluorescence studies were performed to determine the cellular localization of the recombinant protein.

With our results we demonstrate that the new mutant versions of E7 HPV-16 fused to Calreticulin generates an improved antitumor effect than using the wild type version. This has great impact since these mutations eliminate the E7 transforming ability in order to generate a vaccine with potential therapeutic use humans. Furthermore, we demonstrated that the signal peptide and the KDEL sequence fused to the antigen are able to localize it to the ER with a consequent enhancement of immune response and antitumor effect. These results will have significant clinical applications.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico-uterino constituye un grave problema de salud en la mujer. Anualmente más de 231,000 mujeres mueren a causa de esta enfermedad y más del 80% de estas muertes ocurre en países en vías de desarrollo (Perkin *et al*, 2002). Aunque es un cáncer prevenible mediante de la realización de la prueba de Papanicolaou de manera regular para detectar lesiones pre-cancerosas, su uso en estos países es muy bajo por diferentes causas, principalmente sociales y culturales. Como consecuencia, las lesiones se siguen desarrollando silenciosamente hasta avanzar a estados malignos induciendo la formación de Cáncer Cérvico-uterino (CaCu) (Bharadwaj *et al*, 2009).

Debido a que este tipo de cáncer está íntimamente relacionado con la presencia del Virus del Papiloma Humano (HPV) (zur Hausen, 2009), en los últimos años se han aprobado dos vacunas profilácticas para evitar la infección por los tipos más comunes de este virus, sin embargo, este tipo de vacunas cuenta con varias restricciones y desventajas. Una de ellas es que se recomienda su aplicación en mujeres que no han sido infectadas con el HPV o que se encuentren en estadios iniciales de infección cuando se están expresando las proteínas tempranas del virus. Por esta razón una gran cantidad de mujeres quedan descartadas de su protección, además, de ser costosas y por ende aun no han sido bien distribuidas en los países donde se reporta la mayor incidencia de esta enfermedad (Kawana *et al*, 2009).

Por todo lo anterior se hace imperiosa la necesidad de desarrollar vacunas que funcionen de manera terapéutica ayudando a erradicar los tumores ya establecidos y, principalmente, los que se encuentran en estadios avanzados.

En nuestro grupo de trabajo ya se han obtenido resultados muy prometedores utilizando como vacuna a un adenovirus que expresa la proteína Calreticulina (CRT) fusionada al antígeno E7 nativo del HPV-16 en un modelo murino de CaCu. Esta vacuna demostró un gran efecto antitumoral con lo cual se mejoró significativamente la supervivencia de estos ratones. Sin embargo, si queremos probar el efecto de esta vacuna en estudios clínicos con pacientes es necesario mejorarla a manera de hacerla más segura y eficaz.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto antitumoral de dos versiones mutantes, no transformantes, del antígeno E7, cada una fusionada al potenciador de la respuesta inmune, Calreticulina, con el fin de probarlas en ratones de la cepa *C57BL/6* y compararlas con el adenovirus que expresa la CRT/E7 nativa.

Además para simplificar esta estrategia y con el fin de determinar si la mayor parte de las propiedades antitumorales conferidas a la Calreticulina dependen de su habilidad para ser retenida en el retículo endoplásmico (RE) creamos una versión de E7 que lleva únicamente las señales requeridas para dirigirse al retículo endoplásmico (SP: MLLPVPLLLGLLLGLAAAL), así como la señal de retención en RE (KDEL) y probamos su actividad antitumoral.

ANTECEDENTES

Cáncer Cérvico-uterino

El Cáncer Cérvico-uterino es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras, de evolución lenta y progresiva, que se suceden en etapas de displasia leve, moderada y severa. Posteriormente, tales lesiones evolucionan a cáncer *in situ*, en grado variable, cuando éste se localiza en la superficie epitelial y finalmente a cáncer invasor cuando traspasa la membrana basal (Richart *et al*, 1990).

A pesar de las diversas estrategias desarrolladas para su prevención y tratamiento, el CaCu sigue siendo un problema de salud mundial al ser el segundo más frecuentemente diagnosticado en la mujer alrededor del mundo, además de ser la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer mundialmente. En México durante el año del 2002, este padecimiento fue causante de 2,958 muertes, afectando principalmente a la región sur del país (Salud Pública de México, 2002).

A partir de la década de los años ochenta se ha identificado al Virus del Papiloma Humano (HPV) como una causa necesaria pero no suficiente para desarrollar la enfermedad. Walboomers y colaboradores reportaron que el CaCu invasor se asocia con la presencia de HPV en 99.7% de los casos. Sin embargo, no todas las mujeres infectadas por este virus desarrollarán cáncer, para esto es necesaria la presencia de otros factores que actúen conjuntamente con el HPV (García *et al*, 2007). Entre los factores adicionales que

influyen en el riesgo de aparición de la enfermedad se encuentran el inicio de las relaciones sexuales antes de los 18 años, tener múltiples parejas sexuales, la multiparidad, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales, la inmunosupresión, la infección por otras enfermedades de transmisión sexual y la desnutrición. Sin embargo, la función específica de estos factores en la aparición del CaCu es poco clara aún (Almonte *et al*, 2008).

En la mayoría de las personas que tienen el HPV las defensas del cuerpo son suficientes para eliminar el virus, sin embargo, para algunas personas, ciertos tipos de virus pueden convertirse en verrugas genitales o dar lugar a tumores benignos en el cuello uterino (Koutsky *et al*, 1997). Las mujeres que no eliminan ciertos tipos de virus pueden presentar cambios anormales en el revestimiento del cuello uterino. Si estas células anormales no son detectadas o tratadas, pueden avanzar hacia displasia y cáncer. Frecuentemente, el desarrollo del CaCu puede requerir varios años, aunque en algunas ocasiones puede ocurrir en menor tiempo, por esta razón la detección temprana es muy importante (Wheeler *et al*, 2008).

Virus del Papiloma Humano

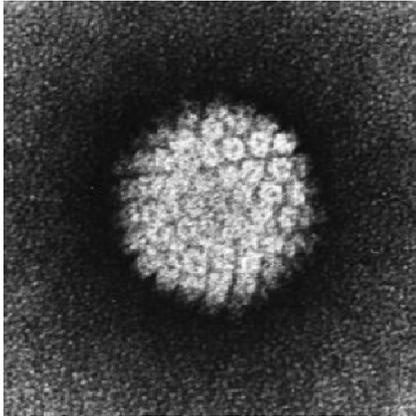
El Virus del Papiloma Humano es un grupo vírico que infecta una gran cantidad de organismos, desde aves hasta mamíferos, incluido el hombre. Es considerado como una de las causas más comunes de enfermedades de transmisión sexual tanto en hombres como en mujeres alrededor del mundo. Estos virus infectan de manera específica a las células de la capa basal del epitelio escamoso estratificado queratinizado o no queratinizado y se

replican en el núcleo de manera dependiente de la diferenciación celular. Los Papilomavirus tipo cutáneos tienen como blanco la piel de las manos y los pies, mientras que los Papilomavirus tipo mucosas infectan la cavidad interna de la boca, garganta, tracto respiratorio y epitelio anogenital. El HPV causa principalmente lesiones tumorales benignas que se logran controlar después de cierto tiempo, no obstante, en algunas ocasiones estas lesiones progresan y se convierten en tumores malignos (Zheng *et al*, 2006; Burd, 2003).

En base a su asociación con el potencial de desarrollo de cáncer cérvico-uterino, los Papilomavirus Humanos también se agrupan en HPV de bajo y alto riesgo. Dentro de los de bajo riesgo se encuentran los tipos 6 y 11, mientras que dentro de los de alto riesgo están incluidos los tipos 16, 18, 31 y 56 entre otros (Zheng *et al*, 2006; Burd, 2003). A pesar de que cerca de 15 tipos del HPV han sido encontrados en más del 95 % de biopsias de CaCu analizadas, solo el tipo 16 es el responsable del desarrollo del CaCu en el 58.9 % de los casos (Muñoz, 2003), además de ser el tipo con mayor distribución geográfica (Yamada *et al*, 1997).

Los Papilomavirus son virus no envueltos con una cápside icosaédrica formada por 72 capsómeros y un tamaño del virión de 55 nm (Tchernev, 2009). La estructura de la cápsula externa del HPV está determinada por las proteínas de la cápside, que están codificadas por la región tardía del genoma del HPV.

A



B

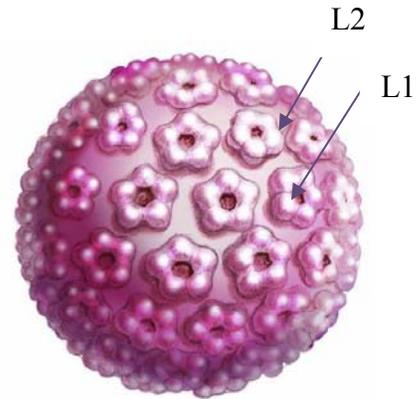


Figura 1. Virus del Papiloma Humano. En esta figura se muestra (A) una micrografía de las partículas virales del HPV-16 y (B) un modelo generado por computadora.

ESTRUCTURA DEL GENOMA DEL VPH

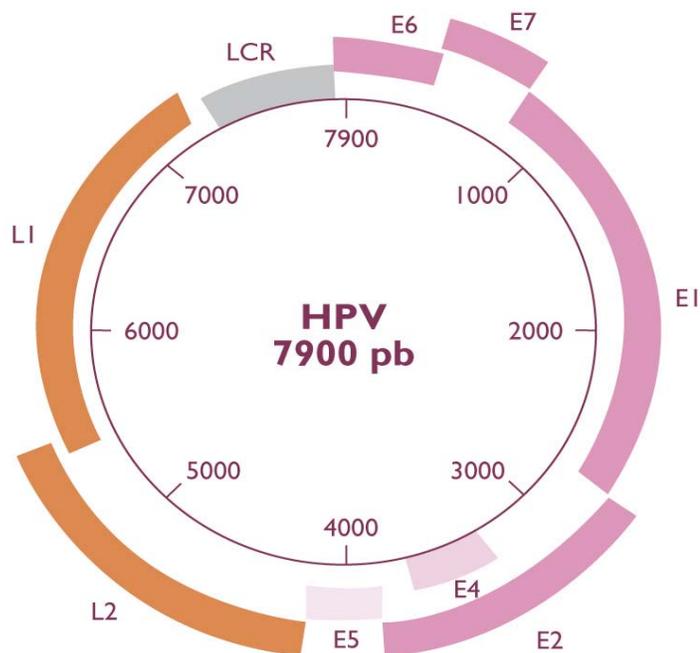


Figura 2. Estructura del genoma del HPV. El genoma del HPV-16 está organizado en tres regiones: no codificante (LCR), temprana (E) y tardía (L).

-
- L1, la proteína estructural principal de la cápside, es triangular. Cinco proteínas L1 de la cápside se unen formando un pentámero y 72 pentámeros forman la cubierta esférica de proteínas L1 de la cápside del HPV (Baker *et al*, 1991).
 - La proteína estructural menor, L2, parece desempeñar una función de soporte entre los 72 pentámeros de L1. En cada cápside del virión se encuentran entre 7 y 20 copias de la proteína L2 (Sapp *et al*, 1995).

El genoma del HPV contiene unos 8.000 pares de bases (Danos *et al*, 1982) y está dividido en tres regiones funcionales: no codificante, temprana y tardía (Prendiville *et al*, 2004).

- **Región temprana:** contiene las secuencias del marco abierto de lectura codificante de las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Se expresan primero en el ciclo vital del virus, sólo en las células basales, parabasales e intermedias del epitelio cervical, participando en la replicación viral (E1, 2, 4 y 5) y favoreciendo la división de la célula huésped, lo que puede provocar la oncogénesis (E6 y 7).
- **Región tardía:** esta región codifica las proteínas estructurales L1 y L2, que se expresan más adelante en el ciclo vital del virus, sólo en las células superficiales del epitelio cervical.
- **Región no codificante:** también se denomina región larga de control (LCR) o región reguladora ascendente (URR) y consta de 400 a 1000 pares de bases. Esta región contiene las secuencias promotoras, intensificadoras (enhancer) y silenciadoras que regulan la replicación del DNA viral.

En los últimos años la descripción del genoma, los mecanismos de replicación, transcripción y la regulación post-transcripcional de los Papilomavirus ha avanzado enormemente teniendo como modelo principalmente al HPV-16. Un punto importante acerca de los estudios que se producen sobre el HPV-16 es la búsqueda de posibles blancos terapéuticos que hagan posible la generación de técnicas que mejoren el tratamiento de las infecciones y de los posibles tumores generados por estos virus. Todo esto basado en el uso de antígenos específicos de tumor (TSAs) que permiten la discriminación de células infectadas de las no infectadas, pudiendo de esta manera, generar terapias menos agresivas y más efectivas para combatir los procesos oncogénicos provocados por los tipos de HPV de alto riesgo (De Marco *et al*, 2003; Peng *et al*, 2004).

Transformación Celular

En trabajos que intentan explicar el modelo de infección por los HPV de alto riesgo se ha reportado que durante la actividad sexual, el microtrauma del epitelio genital, en particular en la zona de transformación del epitelio cervical, permite la exposición de las células basales en activa proliferación, a los diferentes tipos de HPV. Tanto en esta capa de células como en las parabasales, los HPV expresan las proteínas tempranas E1, E2 y E5 confinadas al núcleo y en escasa cantidad. Esto potencialmente limita la respuesta inmune efectiva, en comparación con otras condiciones en las cuales el virus se replica activamente (Giroglou *et al*, 2001).

Las proteínas tempranas E1, E2 y E5 promueven la proliferación, retardan la diferenciación celular y producen el engrosamiento atípico del epitelio, ocasionando un incremento en la cantidad de células de la capa basal lo cual resulta en el retraso de la diferenciación terminal induciendo la formación de una capa de hiperplasia (verruga) dando lugar a un crecimiento anormal de la célula. Las células infectadas siguen expandiéndose verticalmente, diferenciándose a células escamosas en donde las proteínas E4, L1 y L2 son expresadas en abundante cantidad produciendo la progenie viral (sitio anatómicamente superficial donde las células del sistema inmune tienen acceso limitado) (Chow y Broker, 1994). Las lesiones por HPV aparecen entre 3 semanas y 8 meses después de la infección inicial, aunque la mayoría de ellas son asintomáticas y usualmente se necesitan años o décadas para la transformación maligna (Wheeler, 2008).

Cuando el HPV está asociado con lesiones de piel benignas, el genoma viral se replica como un episoma extracromosomal independientemente del DNA de la célula hospedera. Por el contrario en la mayoría de las lesiones malignas el DNA viral se integra en el cromosoma de la célula hospedera (Dürst *et al*, 1985). Cuando la integración ocurre, el genoma del virus sufre un rompimiento en las regiones de los genes E1/E2 ocasionando la pérdida de la función de estas proteínas. Esto libera la represión de los genes E6/E7 resultando en proliferación celular (Shah y Howley, 1990). A pesar de que se ha demostrado que E6 y E7 bloquean la actividad supresora de tumor de p53 y pRB respectivamente, la sola infección con el HPV no es suficiente para inducir cáncer, lo cual indica que se requieren de otros factores genéticos y locales para el progreso de la malignidad. Esto se ilustra por la rara ocurrencia de cáncer comparada con la infección por

el HPV y el largo periodo de tiempo necesario para la progresión de neoplasia cervical intraepitelial a cáncer (Burd, 2003).

Gen E7 del HPV-16

El gen E7 codifica la proteína oncogénica más importante del HPV. El potencial de immortalización y transformación de E7 se ha demostrado en cultivo de tejidos y en modelos animales (Münger *et al*, 2002). El descubrimiento de la inactivación del gen supresor de tumor pRb por E7 provee una explicación básica de cómo los HPV de *alto* riesgo inducen sus efectos oncogénicos en células cervicales (Howley *et al*, 1991). Sin embargo, las propiedades de unión de E7 de los tipos de *bajo* y *alto* riesgo oncogénico difieren en muchas propiedades bioquímicas y funcionales ya que la proteína E7 de los tipos de *bajo* riesgo se une inefficientemente a pRb (Howley *et al*, 1996).

La proteína E7 del HPV-16 es una fosfoproteína nuclear ácida sin actividad enzimática (Pahel *et al*, 1993). Está compuesta de 98 aminoácidos (aa) con un peso molecular teórico de 11 kDa, sin embargo presenta un patrón electroforético con una movilidad relativa de 19 kDa (Barbosa *et al*, 1989). E7 se une al Zn^{2+} a través de dos motivos conservados Cys-X-X-Cys (Figura 3) presentes en su extremo carboxilo formando un dedo de Zinc (Firzlaff *et al*, 1991). E7 se une a pRB e induce su hiperfosforilación (Figura 4) y evita su unión al factor de transcripción E2F, el cual a su vez activa la expresión de genes para la proliferación celular (Storey *et al*, 1988). El gen E7 por si solo

es capaz de transformar líneas celulares de ratones *in vitro* y cooperar con el oncogén *ras* activado para transformar células epiteliales de riñón de rata (Zerfass *et al*, 1995).

Respuesta Inmune contra el HPV

El organismo posee diferentes mecanismos para eliminar la infección del virus, uno de ellos es la respuesta inmune humoral mediante la neutralización viral mediada por anticuerpos específicos contra el virus. Esta respuesta evita la propagación de una infección aguda y protege en contra de una re-infección. Las inmunoglobulinas IgG e IgA presentes en la mucosa pueden jugar una parte importante en la defensa del hospedero mediante el bloqueo de la unión del virus a las células epiteliales de la mucosa. Los anticuerpos circulantes o el sistema de complemento aglutinan y opsonizan partículas virales por medio del fragmento proteolítico cristalino de la IgG (“Fc”) o proteína del complemento (“C3b”) facilitando la fagocitosis mediada por receptores. Sin embargo una vez que la infección ha ocurrido los anticuerpos son incapaces de eliminar el virus, particularmente si el virus es capaz de entrar en un estado latente en el cual su DNA se integra al cromosoma del hospedero (Stanley *et al*, 1994).

Dentro de la respuesta inmune celular tenemos dos componentes principales que son los linfocitos T citotóxicos (CTL) también conocidos como CD8⁺ y las células T ayudadoras de tipo 1 (Th1) también conocidos como CD4⁺. Las células Th1 activadas producen citocinas incluyendo interferón- γ (INF- γ) e interleucina-2 (IL-2).

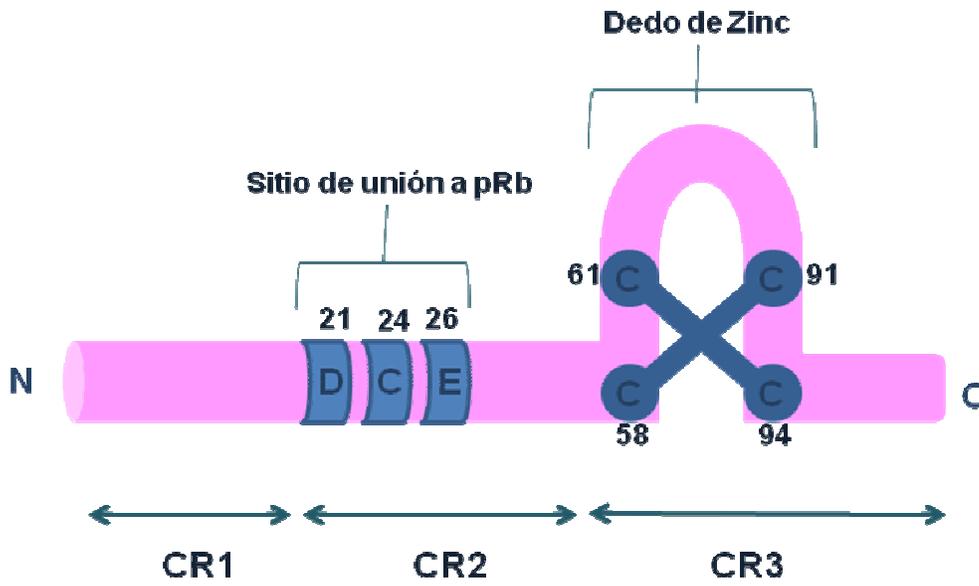


Figura 3. Estructura del antígeno E7. Esta proteína posee tres dominios conservados llamados CR1, CR2 y CR3. En los dominios CR2 y CR3 se encuentran los sitios responsables de su capacidad transformante.

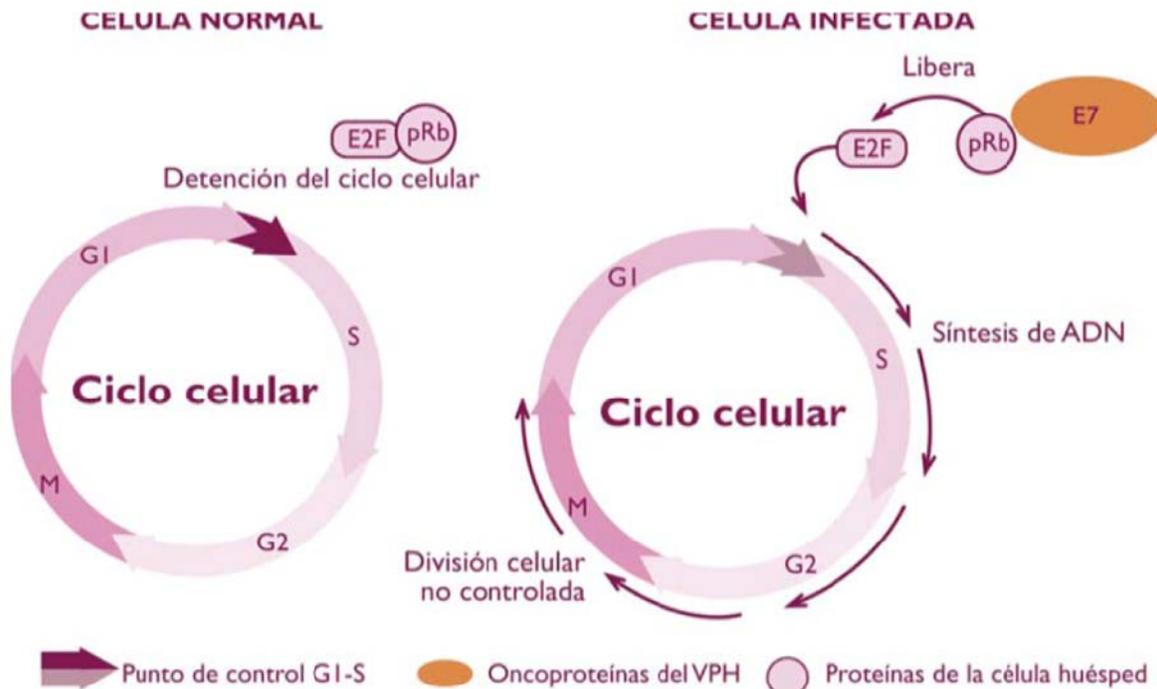


Figura 4. Mecanismo de transformación de E7. La proteína E7 es capaz de unirse a la proteína pRb liberando al factor de transcripción E2F, el cual a su vez activa genes que son necesarios para la división celular.

El INF- γ actúa directamente en la eliminación del virus por la inducción de un estado antiviral en las células, mientras que la IL-2 actúa indirectamente asistiendo la activación de los CTL precursores hacia una población efectora. Ambas INF- γ e IL-2 activan las células “natural killer” (NK), las cuales son importantes en los primeros días de la infección hasta el desarrollo de una respuesta específica por parte de los CTL. En la mayoría de las infecciones virales la respuesta de CTL se desarrolla en 3 a 4 días. Como los CTL destruyen las células infectadas ellos también eliminan las fuentes potenciales para una nueva infección (Zinkernagel *et al*, 1996). Las células blanco para la lisis mediada por CTL serían los queratinocitos presentes en las capas intermedias del epitelio escamoso donde la transcripción y replicación viral se lleva a cabo y las proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) son abundantemente expresadas. Las proteínas tardías L1 y L2 no son buenos blancos para los CTL ya que se expresan en las capas superficiales donde las células ya están liberadas. Sin embargo, se pueden dirigir anticuerpos neutralizantes hacia estas proteínas para prevenir una infección *de novo* (Keating *et al*, 1995). Por lo tanto, la defensa ideal contra estas infecciones podría ser una combinación de anticuerpos neutralizantes, la lisis celular de células infectadas mediante la respuesta de CTL y la prevención de una subsecuente re-infección por la liberación de viriones (Schiller y Roden, 1995).

Mecanismos de Evasión del Sistema Inmune

La infección persistente de HPV sumada a cofactores moleculares parcialmente conocidos más una respuesta inmune local fallida en la paciente, son probablemente los

elementos más importantes que participan para la carcinogénesis cervical y la progresión tumoral. Se han identificado algunos mecanismos por los cuales estos virus evaden las respuestas inmunes innata y celular (Tindle *et al*, 2002).

Las células tumorales del CaCu son deficientes en la presentación de los antígenos propios y extraños por vía endógena, tanto por la desregulación en la expresión de moléculas de clase I del MHC (o HLA en el humano) como de las proteínas del sistema de transportación del antígeno del citoplasma a la luz del retículo endoplásmico (Tap1-Tap2) (Scott *et al*, 2001; Keating *et al*, 1995).

Por otro lado, se ha observado en diversos estudios que en líneas celulares de cáncer cérvicouterino los niveles de los transcritos de los genes virales es muy alto, mientras que las proteínas virales son difícilmente detectables, esto posiblemente es el resultado de una presión evolutiva por escapar del sistema inmune del hospedero, favoreciendo a aquellos virus que integran mutaciones en su genoma que resulten en codones poco utilizados por las células del hospedero, permitiendo así que los niveles de expresión de las proteínas virales se mantengan a niveles bajos para poder persistir como comensales en las células infectadas (Cid-Arregui *et al*, 2003; Kim *et al*, 2005; Lin *et al*, 2006; Wang *et al*, 2007). Otra ventaja que posee este virus es que no produce lisis celular por lo cual los antígenos virales no están disponibles para ser tomados y presentados por las células presentadoras de antígenos y por lo tanto se limita la inducción de linfocitos T citotóxicos específicos (Frazer, 1998).

Desarrollo de vacunas contra el HPV

Ya que la prevalencia actual de muertes por cáncer cérvico-uterino a nivel mundial es alta, se han venido desarrollando diferentes métodos físicos y químicos de tratamiento. Entre estos podemos mencionar a la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la crioterapia con sus respectivas variantes o adaptaciones (Sellors y Sankaranarayanan, 2003; Hernández *et al*, 2005). En la mayoría de los casos estos tratamientos provocan una serie de peligrosas reacciones secundarias que dañan al paciente y, aunado a esto, en un buen porcentaje de los casos no se logra resolver el problema y las pacientes recaen.

Debido a las deficiencias de las terapias existentes para combatir el CaCu en la actualidad se ha optado por recurrir a una nueva generación de tratamientos basados en el uso de la llamada *Terapia Génica* (Jinoch *et al*, 2003). Dentro de estas terapias se encuentra el uso de fragmentos de DNA desnudo, proteínas y péptidos como antígenos y el uso de moléculas estimuladoras del sistema inmune, como por ejemplo, las citocinas. Otros trabajos se han enfocado en la búsqueda de vectores para la administración efectiva de dichas moléculas en el interior de los tejidos infectados; ya que al administrar péptidos o proteínas como antígenos, estos son rápidamente degradados e inducen tolerancia. Dentro de estos vectores alternativos podemos nombrar a liposomas, bacterias, partículas similares a virus, retrovirus, y adenovirus (Bermúdez-Morales *et al*, 2005; Rozaléna *et al*, 2003); estos últimos se han convertido hoy en día en una de las principales elecciones a la hora de llevar a cabo pruebas clínicas (Alba *et al*, 2005).

Uso de Vectores Adenovirales

Los adenovirus son miembros de la familia Adenoviridae y están constituidos por una cápside externa, un núcleo proteico central que cubre al DNA lineal y varias proteínas accesorias. La cápside de aproximadamente 75 nm de diámetro, tiene una conformación icosaédrica y está constituida por 252 subunidades o capsómeros (Martínez-Flores *et al*, 2006; Russell *et al*, 2000). Los vectores adenovirales son construcciones artificiales en las que se realizan modificaciones en el genoma viral, mediante el reemplazo de algunos segmentos con DNA de una fuente externa, pudiendo introducir de esta manera dicho material genético en el interior de las células blanco con una alta eficiencia de entrega (Tatsis y Ertl, 2004). Los adenovirus como vectores de transferencia de genes, tienen una serie de ventajas, por ejemplo, tienen la capacidad de poder incorporar grandes fragmentos de DNA en su genoma, poseen una alta eficiencia de transfección, pueden ser manipulados genéticamente para evitar su patogenicidad, pueden infectar células que se estén o no dividiendo, son inmunogénicos por sí mismos, permanecen de manera episomal dentro del núcleo, permiten hacerles modificaciones sencillas en su cápside para replantear su tropismo tisular y rutinariamente son obtenidos altos títulos virales (más de 10^{13} partículas/ml.) (Alba *et al*, 2005; Kreppel y Kochanek, 2004).

Estado actual de las vacunas contra el cáncer cérvico-uterino

Como ya hemos señalado, la preocupación por lograr generar tratamientos lo más efectivos posibles en contra del principal agente causal del CaCu, el HPV, ha llevado a la

investigación exhaustiva de diferentes mecanismos que nos puedan brindar dicho objetivo. Actualmente se han aprobado por la FDA dos vacunas profilácticas que aparentemente muestran niveles bastante altos de protección en contra de infecciones provocadas por ciertos tipos de HPV. En referencia a esto, podemos mencionar en primera instancia a *Gardasil™*, una vacuna cuadrivalente producida por la empresa Merck & Co., que protege contra cuatro tipos de HPV: 6, 11, 16 y 18 (dirigida contra la proteína de expresión tardía L1) y se administra en una serie de tres inyecciones en tejido muscular por un período de 6 meses (Siddiqui *et al*, 2006). Otra vacuna prometedora es, *Cervarix™*, producida por GlaxoSmithKline (GSK) Esta vacuna bivalente tiene igualmente como blanco a la proteína de la cápside L1 de dos tipos de HPV: 16 y 18. Los resultados iniciales demuestran que esta vacuna protege también contra la infección persistente de estos dos tipos de HPV y se administra de igual forma en tres dosis por un período de 6 meses (Szarewski, 2010).

Estas vacunas que actualmente son de las principales estrategias para combatir el CaCu, protegen primariamente al inducir la producción de anticuerpos contra la infección y el desarrollo de cambios en las células cervicales que se ven en las pruebas de Papanicolaou y que pueden resultar en cáncer (Steinbrook *et al*, 2006), sin embargo la proteína L1 utilizada en estas vacunas se expresa principalmente en los estadios tempranos de la infección por HPV cuando los virus se encuentran produciendo mas partículas virales y su expresión disminuye conforme el genoma viral se va integrando al genoma de las células hospederas (Zheng *et al*, 2006), por lo cual su uso queda confinado como vacuna profiláctica.

Dentro de las principales desventajas de este tipo de vacuna incluyen su alto costo de producción ya que el sector que está más vulnerable a este padecimiento es el de bajo nivel socioeconómico. Además los beneficios de estas vacunas se centran en aquellas mujeres que aun no han sido expuestas al virus, con lo cual queda excluida una gran parte de la población en la que este tipo de infecciones puede seguir progresando hasta alcanzar la malignidad. Algunos profesionales de la salud creen que la aplicación de esta vacuna podría propiciar algunas otras desventajas como llevar a las mujeres jóvenes a tener conductas sexuales de riesgo, al saberse protegidas por la vacuna o prescindir de los chequeos anuales mediante el Papanicolaou, siendo que estas vacunas solo las protegen de la infección de algunos tipos de HPV oncogénicos (Bharadwaj *et al*, 2009).

Uso de E7 como antígeno del HPV en la elaboración de vacunas

Los tumores inducidos por virus expresan antígenos bien definidos de origen viral los cuales son más fáciles de reconocer por el sistema inmune que los tumores de origen no viral. En las décadas pasadas se identificaron las proteínas E6, E7, E2, L1 como antígenos específicos de tumor (TSAs) del CaCu siendo las oncoproteínas E6 y E7 usadas para inducir inmunidad (Shillitoe, 2006).

He y colaboradores probaron adenovirus y virus vaccinia expresando ambos la oncoproteína E7, encontrando que el adenovirus confirió una mejor protección profiláctica y terapéutica antitumoral en comparación con el virus vaccinia. En este mismo estudio se evaluó la inmunogenicidad del antígeno E6, expresado por los vectores antes mencionados,

encontrando que E6 es menos eficiente que E7 para conferir protección contra el desarrollo de tumores y además concluyen que E6 carece de epítopes suficientemente antigénicos para despertar una respuesta inmune celular en contra del tumor (He *et al*, 2000).

Otra estrategia que se ha reportado para aumentar la presentación del antígeno E7 ha sido la creación de vacunas de DNA en la cuales se fusionó E7 diferentes proteínas como la proteína de membrana asociada al lisosoma 1 (LAMP-1), la proteína de choque térmico HSP70 o la Calreticulina (CRT). Las tres construcciones generaron una respuesta significativa de CD8+ específica para E7, siendo la fusión CRT/E7 la que generó más CD8+ en comparación con las otras construcciones (Kim *et al*, 2004). Como la vacuna de DNA expresando la CRT/E7 mostró buenos resultados, este mismo grupo de investigadores evaluó la CRT/E7 pero expresada por un sistema de virus vaccinia. La vacunación intraperitoneal con Vac-CRT/E7 incrementó dramáticamente la secreción de INF- γ , células CD8+ específicas para E7 y un potente efecto antitumoral en comparación con Vac-E7 o Vac-CRT (Hsieh *et al*, 2004).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el uso de un adenovirus que expresa la fusión de la CRT a la proteína E7 posee un potente efecto antitumoral (Gómez *et al*, 2007) y más importante aún, debido a que en la mayoría de los pacientes de países en vías de desarrollo el desarrollo de CaCu generalmente se detecta en estados avanzados (Sankaranarayanan *et al*, 2004) se probó el efecto terapéutico de estos virus tanto en estadios tempranos como tardíos de los tumores inducidos a los ratones observándose resultados impresionantes.

La línea celular utilizada para estos experimentos es la TC-1 las cuales son células epiteliales de pulmón de ratones de la cepa C57BL/6 transformadas con los genes E6 y E7 del HPV-16 y con el oncogen *ras* (Lin *et al*, 1996).

En los ratones que fueron sometidos al esquema de inmunización con el adenovirus poco tiempo después de la inducción de tumor con células TC-1 ningún ratón desarrolló tumor al menos por 60 días, y no se observó crecimiento de tumor en este grupo cuando se retaron por segunda vez con células tumorales TC-1, no así en los controles Ad-E7 y Ad-LacZ. En otro experimento los ratones recibieron las inmunizaciones con este adenovirus una vez que el tumor inducido en ellos había alcanzado un tamaño de 2mm observándose una drástica regresión tumoral. Además, no se observó crecimiento de tumor por un periodo de 60 días ni después de una segunda inoculación con células tumorales al día 70 con lo cual se concluyó que es este adenovirus es capaz de conferir una memoria inmunológica a largo plazo. Por lo tanto el adenovirus expresando la fusión de CRT/E7 tiene un gran potencial para ser usado en el tratamiento de CaCu avanzado (Gómez *et al*, 2007).

Mutaciones en el antígeno E7

Aunque el efecto profiláctico y terapéutico observado en las vacunas que manejan la versión nativa de E7 es bastante significativo hay que recordar, que la proteína E7 del HPV-16, por si sola es capaz de transformar diferentes líneas celulares establecidas

(Vousden *et al*, 1988; Kanda *et al*, 1988), y por cuestiones de seguridad, su uso en futuros estudios en humanos, está limitado.

Shi y colaboradores desarrollaron una versión de E7 mutante, consistiendo en la sustitución de dos residuos de cisteínas, localizadas en la posición número 58 y 91, por glicinas. Esto provoca la pérdida de el motivo estructural de unión a Zinc, ubicado en la región CR3, lo cual resulta en una proteína muy inestable que la lleva a ser degradada rápidamente aumentando con esto la cantidad de fragmentos o epítopes de esta proteína disponibles para ser presentados vía MHCI. En cuanto a la capacidad inmunoestimuladora de esta versión mutante, se observó que mejoró notablemente la respuesta inmune celular específica contra células tumorales que expresan la proteína E7, mediada por linfocitos T citotóxicos específicos, además que incrementó los niveles de presentación de antígenos de E7 vía MHCI (Shi *et al*, 1999).

Aunque se ha demostrado que mutaciones en estos residuos de cisteína disminuyen drásticamente la capacidad transformante de la proteína, ésta conserva su capacidad de unión a la proteína supresora de tumor pRb debido a que el sitio de unión a pRb se encuentra en el motivo XLCXE (aa 21-26) de la segunda región conservada (CR2). Una vez que E7 se une a pRb por el dominio CR2 se logra la disrupción del complejo pRb/E2F mediante la porción del dedo de zinc por el dominio CR3 (Liu *et al*, 2006).

En distintos estudios se ha probado la capacidad transformante de diversas versiones de E7. Cambios en los aminoácidos C24 y E26 reducen sustancialmente la afinidad por pRb y la sustitución de la cisteína en el aminoácido 24 por una glicina o la delección de los

aminoácidos 21 al 24 eliminan tanto su capacidad transformante como su capacidad de unión a pRb (Münger *et al*, 1993).

Calreticulina como potenciador de la respuesta inmune

Una de las estrategias desarrolladas para despertar una respuesta antitumoral específica contra células tumorales que expresen el antígeno E7, ha sido la fusión de este antígeno a proteínas de potencial antigénico conocido las cuales pudieran favorecer la inducción de una respuesta celular específica contra E7. Entre estas, se encontró que la fusión de la E7 a la proteína de shock térmico llamada Calreticulina (CRT) es la que mejor permite desarrollar una respuesta inmune específica contra tumores que expresan E7 en comparación a otras 4 vacunas (Kim *et al*, 2004).

La Calreticulina es una proteína abundante de 46 kDa, que se localiza en el interior del retículo endoplásmico (RE), relacionada a las proteínas de choque térmico. Se ha visto que esta proteína dirige la presentación de antígenos, mediante su asociación con los péptidos entregados dentro del RE a través de las proteínas transportadoras de antígeno (TAP1 y TAP2) (Spee *et al*, 1997) así como por la asociación con la β 2 microglobulina del MHCI (Sadasivan *et al*, 1996).

En trabajos anteriores se ha demostrado el efecto adyuvante de la CRT. Uno de ellos mostró que la administración de complejos péptido-Calreticulina, promueve una respuesta citotóxica específica contra el péptido (Hsieh, 2004) mientras que en otro más, se indujo un efecto antitumoral específico a través de la administración de péptidos

purificados de extractos de tumor unidos a Calreticulina (Sadasivan *et al*, 1996). La Calreticulina en vacunas basadas en DNA, conserva su potencial como molécula adyuvante, esto se demostró al inmunizar ratones con la fusión de la secuencia codificante de la Calreticulina a la proteína E7 del HPV-16. Estos ratones exhibieron un fuerte incremento en las células precursoras de linfocitos T citotóxicos específicos de E7, así como un importante efecto antitumoral contra tumores que expresaban E7 en comparación a aquellos inmunizados únicamente con E7 tipo silvestre (Cheng *et al*, 2005).

Aunque no se tiene bien definido cómo la Calreticulina favorece la potenciación de la respuesta inmune celular específica, existen varios posibles mecanismos. Uno de estos está relacionado a la ubicación de la Calreticulina dentro del RE, donde se lleva a cabo el ensamblaje de epítopes, de proteínas que fueron previamente degradadas en el citoplasma por los proteosomas, en las moléculas del MHCI. Se ha reportado que sólo un péptido se une a una molécula de MHCI por cada 10^4 proteínas degradadas por el proteosoma (Yewdell *et al*, 2001). Además el antígeno E7 se localiza en el núcleo, por lo que los niveles de antígeno en citoplasma disponibles para su presentación son mínimos. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que al encontrarse fusionada a la Calreticulina, la proteína E7 puede ser llevada hacia el interior del RE, lo que la acerca al sitio de procesamiento y ensamblaje en el MHCI (Gómez *et al*, 2007).

Nuevas versiones mutantes del antígeno E7.

Tomando en cuenta todo lo anterior, en esta tesis se trabajó en el desarrollo de dos versiones mutantes de E7 (Figura 5A) sin capacidad transformante. Una de ellas (E7m) es

la reportada por Shi, 1999, la cual tiene mutadas las dos cisteínas de los aminoácidos 58 y 91 por glicinas. Esta versión mutante se probará fusionada a Calreticulina (CRT/E7m), ya que no sabemos si esta versión mutante sin capacidad transformante será procesada de la misma manera que la silvestre y si será capaz de montar una mejor respuesta antitumoral al estar fusionada a Calreticulina.

Con el fin de crear una vacuna aún más segura se realizó otra versión de E7 llamada doble mutante (E7dm), que contiene las mismas mutaciones antes mencionadas más una deleción en los aminoácidos 24 a 26 que corresponden al sitio de unión a la proteína pRb (Figura 5B), con lo cual se disminuye el riesgo de una posible regresión del fenotipo transformante. Esta versión doble mutante también fue fusionada a Calreticulina (CRT/E7dm), y esta fusión génica fue optimizada para el uso de codones preferenciales tanto para humanos como para ratones.

Además de estas dos versiones mutantes, se decidió estudiar el efecto antitumoral del antígeno E7 fusionado únicamente al péptido señal de la Calreticulina (SP: MLLPVPLLLGLLLGLAAAL) y a su señal de retención en el retículo endoplásmico, KDEL (SP/E7/KDEL) (Figura 6), esto para determinar si el efecto antitumoral conferido por la Calreticulina está dado por su capacidad de llevar y retener a los antígenos en el retículo endoplásmico.

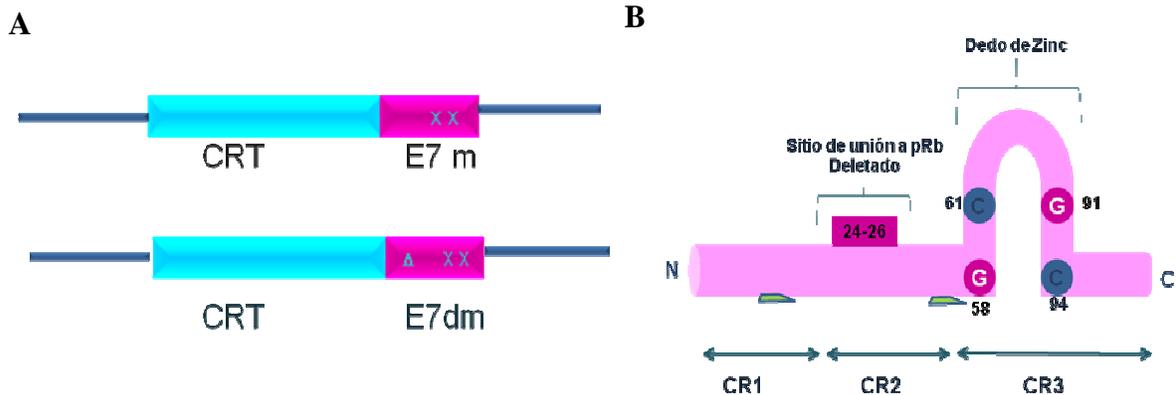


Figura 5. Construcciones CRT/E7dm y CRT/E7m. A) Esquema donde se representan a las dos versiones mutantes fusionadas a Calreticulina. B) Esquema del gen E7 en donde se marcan las mutaciones correspondientes a la versión doble mutante del antígeno E7. Se observa en barras verdes la localización de los epítopes más inmunogénicos para humanos (aa. 11-20) y para ratones (aa. 49-57).

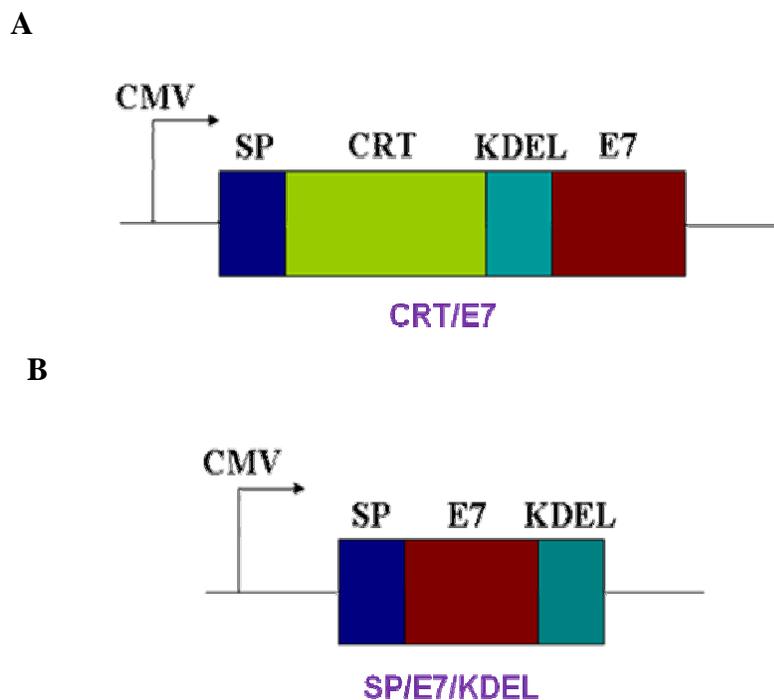


Figura 6. Construcción SP/E7/KDEL. En esta figura se compara la construcción CRT/E7 (A), con la construcción SP/E7/KDEL (B); se representa en color rojo al antígeno E7, en color azul el péptido señal de la Calreticulina presente en ambas construcciones, así como la señal de retención en RE, KDEL, representada en color verde oscuro.

HIPÓTESIS

1. La versión mutante del antígeno E7 posee un mejor efecto antitumoral que el antígeno E7 silvestre del HPV-16.
2. Las señales de envío y retención a retículo endoplásmico fusionadas al antígeno E7 son suficientes para suplir el efecto antitumoral conferido por la Calreticulina.

IMPACTO

Debido al alto número de muertes por cáncer es necesaria la creación de nuevas terapias que ayuden a la erradicación de esta enfermedad. Recientemente se ha reportado resultados muy prometedores al probar vacunas antitumorales que emplean la fusión del antígeno E7 al potenciador de la respuesta inmune Calreticulina, sin embargo este antígeno posee capacidad transformante por sí mismo, por lo cual su uso en humanos no es recomendable ya que conlleva el riesgo de transformar tejido sano. Por lo anterior en esta tesis se trabajó con versiones mutantes sin capacidad transformante, las cuales fueron fusionadas a Calreticulina para probar su efecto antitumoral. Por otro lado, es importante conocer el mecanismo por el cual la Calreticulina potencia el efecto antitumoral de los antígenos fusionados a ella, por esto analizamos el efecto antitumoral de una versión de E7 fusionada únicamente al péptido señal y la señal de retención en retículo KDEL. Estos resultados pueden tener un buen impacto en la investigación clínica.

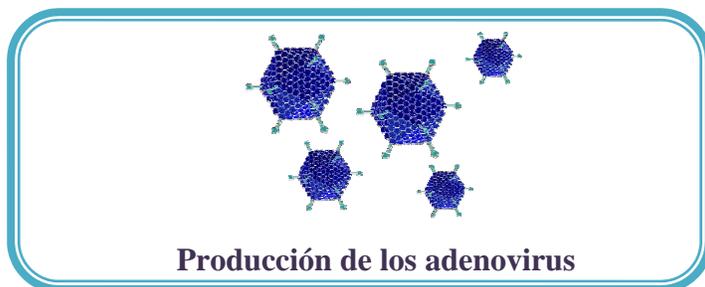
OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antitumoral de la inmunización con adenovirus que codifiquen para versiones mutantes de E7 del HPV-16 fusionadas a Calreticulina en un modelo murino por medio de terapia génica adenoviral.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Construir los adenovirus que codifiquen para las versiones de E7 mutantes del HPV-16 fusionadas a Calreticulina.
- Determinar la localización celular de las proteínas mutantes fusionadas a Calreticulina.
- Analizar el efecto antitumoral de los adenovirus que codifiquen para las versiones mutantes de E7 del HPV-16 fusionadas a Calreticulina.
- Analizar el efecto antitumoral de una versión del antígeno E7 fusionada a las señales de envío y retención al retículo endoplásmico de la Calreticulina.

DISEÑO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de las diferentes versiones del antígeno E7.

Construcción CRT/E7m

Para realizar la fusión de la Calreticulina a la versión de E7 con las mutaciones en los aminoácidos 58 y 91 se partió del plásmido BC219 donado por el Dr. Shi que codifica para la E7 mutante a la cual se le realizó una amplificación con los siguientes primers: **E7F-ECORI: 5'** CGGAATTCCTGCATGGAGATACACCTAC y **E7EVKIRw: 5'** CGGGTACCGATATCTTATGGTTTCTGAGAACA.

La reacción se realizó de acuerdo a las especificaciones técnicas de la enzima *Pfx* (Invitrogen Corp., USA) con el siguiente ciclo de amplificación: 94°C por 4min, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 68°C por 1.5 min. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1.2%, se purificó del gel con el kit de purificación Gel Clean Up System (Promega Corp. USA), se digirió con las enzimas *EcoRI* y *KpnI* (New England Biolabs, Inc.), y se purificó de nuevo. Por otro lado se digirió el plásmido PCDNA3.1-CRT-E7 con las mismas enzimas y se purificó el vector sin el gen de E7. Este vector se ligó con el producto de PCR digerido y las clonas resultantes se secuenciaron. Una vez confirmado que no existieran mutaciones se llevó a cabo una nueva amplificación, esta vez para clonar la fusión CRT/E7m al vector transbordador pShuttle (Quantum Biotechnologies, Montreal, QC, Canada). Los primers utilizados fueron los siguientes:

CalXhoFw: 5'CCGGCTCG AGATGCTGCTCCCTGTGCCGCT y **E7EVKIRw:** 5'
CGGGTACCGATATCTTATGGTTTCTGAGAACA.

Al confirmar la amplificación en un gel de agarosa, el producto de PCR se purificó y se digirió con la enzima *EcoRV* (Promega Corp, USA) por una hora, se inactivó la enzima a 65°C por 15 min, y posteriormente se digirió con la enzima *XhoI* de la misma compañía por 1.5 horas. El mismo proceso se realizó para linearizar el vector transbordador pShuttle (Quantum Biotechnologies, Montreal, QC, Canada). Luego de la digestión, se corrieron en un gel de agarosa, tanto el producto de PCR digerido como el vector abierto, y se purificaron los fragmentos con el kit de purificación Gel Clean Up System (Promega Corp, USA). Estos se ligaron con 1U de ligasa (Fermentas Inc., USA) en una relación equimolar 5:1 toda la noche a 4°C para luego transformar la cepa *DH5α* de *E.coli* y seleccionar las clonas resistentes a kanamicina. A las 24 horas se levantaron algunas colonias y se crecieron en medio LB (United States Biological Inc. USA) con kanamicina (Sigma-Aldrich St. Louis, Mo. USA). A éstas se les realizó un miniprep y se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% para observar su patrón de corrimiento. Las clonas positivas se secuenciaron para confirmar que no existiera alguna mutación introducida al momento de realizar la amplificación.

Construcción CRT/E7dm

Para la versión doble mutante se mandó sintetizar en la compañía GeneArt un gen de E7 con la combinación de las mutaciones en los aminoácidos 58 y 91 y con el sitio de

unión a pRB deletado (aa 24-26), el gen se sintetizó ya fusionado a Calreticulina con un sitio *MluI* (Promega, Corp., USA) entre ambos genes y toda la construcción fue optimizada para una mejor expresión en humanos y ratones. Este gen fue clonado por la compañía en el vector pGA4. Se digirieron 300 ng con las enzimas *BglIII* y *NotI* (Fermentas Inc., USA), con el buffer O+ de la misma marca y se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% para verificar que se liberara el gen de interés. Para realizar la clonación del gen CRT/E7dm en pShuttle se digirieron 2 µg del plásmido pGA4 con las enzimas *BglIII* y *NotI*, lo mismo se realizó en el plásmido pShuttle para abrirlo en estos mismos sitios. Luego de la digestión, se corrieron en un gel de agarosa, se purificaron los fragmentos y se ligaron con 1U de ligasa de Fermentas para luego transformar la cepa *DH5α* de *E.coli* y seleccionar las clonas resistentes a kanamicina. A las 24 horas se levantaron algunas colonias y se crecieron en medio LB con kanamicina. A estas se les realizó un miniprep y se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% para observar su patrón de corrimiento. Posteriormente se digirieron las posibles clonas con *BglIII* y *NotI* para observar que liberaran el inserto del tamaño adecuado. Adicionalmente se caracterizaron con otras enzimas de restricción para confirmar que dieran los patrones esperados.

Construcción SP/E7/KDEL

Para la construcción de este gen se amplificó con la enzima *Pfx* (Invitrogen Corp., USA) el gen E7 a partir del plásmido PCDNA3.1 CRT/E7 y se adicionó el péptido señal de la Calreticulina y la señal de retención en retículo KDEL por medio de dos primers que se muestran a continuación: **SIG E7FW: 5'GGTACCATGCTGCTCCCTGTGCCGCTGC**

TGCTCGGCCTGCTCGGCCTGGCCGCCGCCCTGCATGGAGATACACCTACATTGC
ATGAATATATGTTAG y **E7KDEL**RW: 5' AAGCTTCTACAGCTCGTCCTTTGGT
TTCTGAG AACAGATGGGGCACAC.

El programa utilizado para la amplificación fue un primer paso de a 94°C por 4 min seguido de 35 ciclos a 94°C por 15 seg, 58°C por 30 seg y 68°C 30 seg, por último se llevó a 68°C por 5 min; después de la reacción de amplificación se procedió a adenilar el producto de PCR con la enzima *Taq* polimerasa. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.2%, se purificó y se clonó en el vector Topo 2.1; se transformó con esto la cepa DH5 α y las clonas resistentes a ampicilina fueron caracterizadas con enzimas de restricción y secuenciadas. Posteriormente se digirió tanto el vector Topo 2.1 (Invitrogen Corp., USA) con el gen de interés, insertado en el sentido correcto, así como el vector pShuttle con las enzimas *Bgl*III y *Hind*III para clonar el gen SP/E7/KDEL en éste. Las clonas se seleccionaron por su resistencia a kanamicina y se caracterizaron mediante digestión con enzimas de restricción así como por PCR.

Obtención del genoma adenoviral

Para la obtención del genoma adenoviral se intentó realizar la recombinación homóloga del genoma adenoviral con el plásmido pShuttle linearizado con la enzima *Pme*I (New England Biolabs, Inc. USA) por medio de una co-transformación en células electrocompetentes de *E.coli* cepa BJ5183 las cuales permiten la recombinación pero poseen una eficiencia muy baja de transformación. Al no obtener transformantes con este protocolo se

probó con un método alternativo, en el cual se prepararon células BJ5183 calcio competentes y se transformaron por choque térmico con 30 ng del vector adenoviral AdEasy (Quantum Biotechnologies, Montreal, QC, Canada) el cual posee el gen de resistencia a ampicilina; luego de seleccionar las clonas que contenían este plásmido se crecieron en gran cantidad para hacerlas calcio competentes y se transformaron 50 μ l de células por choque térmico con 15 ng del vector linearizado pShuttle que contenía cada uno de nuestros genes de interés; durante la recombinación se pierde el gen de resistencia a ampicilina del AdEasy (Quantum Biotechnologies, Montreal, QC, Canada) y se seleccionaron las clonas que poseían el gen de resistencia a kanamicina el cual se integra a partir del plásmido pShuttle. Estas clonas se caracterizaron con diferentes enzimas de restricción y se corrieron en geles de agarosa para comparar los patrones de restricción entre las clonas positivas y el plásmido AdEasy como control negativo.

Obtención de partículas virales y producción a pequeña escala

Una vez obtenido el genoma adenoviral se realizó una transfección en la línea celular HEK293, la cual expresa de manera constitutiva el gen E1A que se encuentra deletado en el genoma adenoviral y es necesario para la producción de las partículas virales. El experimento se llevó a cabo en una caja de 24 pozos donde se sembraron 8×10^5 células en medio DMEM con Suero Bovino Fetal (Gibco, USA) al 10% y fueron incubadas a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5% por 24 horas. La transfección se llevó a cabo por medio del reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen Corp., USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se observaron las células diariamente en busca de que

apareciera un efecto citopático (CPE) el cual consiste en células redondeadas con núcleos prominentes, estos cambios en la morfología de las células nos indica que las células están produciendo partículas virales y al lisarse se liberarán al medio de cultivo e infectarán a más células vecinas. Como control de la transfección se utilizó el Ad-GFP. Una vez observado un CPE completo se procedió a levantar las células y preparar un extracto crudo para infectar más células y para producir una mayor cantidad de virus para los siguientes experimentos. Para realizar los extractos crudos se pasaron las células y el medio de cultivo a tubos Falcon de 50 ml, se centrifugaron a 1000 x g por 5 min y se retiró el medio para dejar solamente 5 ml, posteriormente se procedió a congelar y descongelar las células a -80°C tres veces para lisar las células y liberar los viriones que se encuentran dentro de estas. Por último se centrifugaron a 2000 x g por 10 min y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo, este se conservó a -80°C hasta su uso.

Determinar la multiplicidad de infección de los adenovirus producidos

El ensayo para determinar la multiplicidad de infección (MOI) sirve para conocer el número aproximado de partículas virales presentes en los extractos crudos que se obtuvieron de la amplificación viral a pequeña escala. Este se realizó en una placa de 6 pozos con 1×10^6 células HEK293 por pozo, en cada pozo se agregaron 0, 5, 10, 20, 50 y 100 μ l del extracto crudo a probar, monitoreándose el cultivo dos veces al día por tres días hasta observar la menor cantidad de virus que fue necesaria para obtener un efecto citopático completo a las 72 h. También se probaron las líneas celulares HeLa y SiHa con el fin de saber la cantidad de adenovirus necesaria para infectar a la mayoría de las células

sin ser tóxico para estas, ya que cada línea celular en específico necesita una distinta cantidad de virus para ser infectada debido a la cantidad de receptores en la superficie celular que puedan ser reconocidos por los virus.

Tinción con X-Gal

Para probar la funcionalidad del adenovirus control Ad-LacZ (*lacZ* codifica para la enzima β -D-galactosidasa) se infectaron células HEK293 con una alícuota de este adenovirus purificado y se realizó una producción a pequeña escala. A las 48 h se adicionó X-Gal a los pozos para detectar la actividad enzimática.

Detección de las proteínas recombinantes

Para realizar este ensayo se sembraron 2×10^5 células SiHa y se infectaron con un MOI de 40 con los adenovirus Ad-GFP, Ad-CRT/E7m y Ad-CRT/E7dm, así también se dejó un pozo con células sin infectar como control negativo de la línea celular. A las 48 horas se realizaron los extractos de proteínas totales mediante el reactivo Proteo Jet Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas Inc., USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante y se realizó una cuantificación de proteínas por medio del kit de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) utilizando a la Gamma Globulina Bovina de la misma marca para preparar los estándares y la curva de calibración. Este ensayo se realizó en una microplaca y las lecturas se realizaron por triplicado.

Una vez determinada la concentración de los extractos se cargaron 40 µg en un gel de Acrilamida-SDS al 12% y se corrieron a 80 volts en buffer Tris-Glicina-SDS (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). El gel se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore Corp. Billerica, MA, EUA) en una cámara de transferencia semi-húmeda por 20 minutos a 120 miliAmperes (mA). Esta membrana se bloqueó en buffer TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6, Tween 20 0.05%) con leche descremada al 10% en agitación por una hora y luego de un lavado en TBST se incubó con los anticuerpos primarios, anti-E7 monoclonal de Santa Cruz (dilución 1:500), el cual va dirigido contra un epítipo no mutado de E7 del HPV-16; y anti-β-actina (Sigma-Aldrich St. Louis, Mo. USA) (dilución 1:10,000) como control de carga. Se incubaron por 3 horas en agitación suave a 16°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a HRP (Pierce Co., USA) (dilución 1:3000) por una hora. Luego de esto se lavó la membrana con TBST y se reveló utilizando el sustrato SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Co., USA).

Para la detección de la proteína recombinante SP/E7/KDEL se trabajó con un coctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich St. Louis, Mo. USA) y el inhibidor de proteosoma de la misma compañía, Calpain Inhibitor I, a una concentración de 30µg/ml. Se estandarizó el tiempo óptimo para la máxima acumulación de proteína con el Ad-LacZ donde se probaron tiempos de 30min, 1 hora, 3 horas, así como controles sin el inhibidor y a tiempo cero. El experimento se realizó en una placa de seis pozos con 3×10^5 células infectadas a un MOI de 1 con 24 horas de infección.

Para realizar el ensayo de western blot se sembraron 2×10^5 de células HEK293 y se infectaron a una MOI de 5 con el Ad-SP/E7/KDEL y los adenovirus Ad-CRT/E7dm y el Ad-LacZ como control positivo y negativo respectivamente. A las 24 horas post-infección se agregó el inhibidor de proteosoma por una hora y se realizaron los extractos de proteínas totales mediante el reactivo Proteo Jet Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas Inc., USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante manteniendo las muestras siempre en hielo. Se cargaron 40 μ g en geles de Acrilamida-SDS al 12% y 15% y se corrieron a 80 volts en buffer Tris-Glicina-SDS. El gel se transfirió a una membrana de PVDF en una cámara de transferencia semi-húmeda por 30 minutos a 200 mA. Esta membrana se bloqueó en TBST con leche descremada al 7% en agitación por una hora y luego de un lavado en TBST se incubó con el anticuerpo primario, anti-E7 monoclonal de Santa Cruz (dilución 1:500) por toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 min con TBST y se incubaron con anti-mouse conjugado a HRP como anticuerpo secundario (dilución 1:3000) por una hora. Luego de esto se lavó la membrana 3 veces con TBST y se reveló utilizando el sustrato Super Signal West Pico (Pierce Co., USA).

Detección de la localización celular de las proteínas recombinantes

Para este experimento se sembraron 1×10^4 células SiHa por pozo en una cámara de cultivo en portaobjetos marca Nunc de 8 divisiones en medio DMEM (Gibco, USA) con FBS al 10% y antibióticos 1X (Sigma-Aldrich St. Louis, Mo. USA) y se dejaron incubando 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, se agregaron los adenovirus correspondientes a un MOI de 20 y a las 24 horas post-infección se retiró el medio, se lavaron las células en

PBS y se fijaron/permeabilizaron las células con metanol:acetona 1:1 por 10 minutos a -20°C, se retiró el fijador y se lavaron una vez con PBS. El bloqueo se realizó con BSA al 1% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente, se retiró el BSA y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-E7 (NM2) y anti-Calnexina (H-70) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a una dilución 1:200 por 2 horas en solución de bloqueo y luego de tres lavados con PBS se agregaron los anticuerpos secundarios anti-mouse Alexa Fluor 594 y anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen Corp., USA) a una dilución 1:500 por 1 hora en solución de bloqueo. Por último se agregó medio de montaje (Vector Burlingame, USA) H-1200 con DAPI.

Producción a gran escala y purificación de las partículas virales

Para la producción a gran escala se cultivaron 4 cajas T-75 con células HEK293 a una confluencia del 90% para cada adenovirus. Una vez alcanzada la confluencia se infectaron con los adenovirus correspondientes a un MOI de 10 para alcanzar un efecto citopático completo aproximadamente a las 72 horas, luego se cosecharon las células para realizar los extractos crudos mediante rondas de congelación y descongelación para liberar los virus al medio de cultivo y proceder a la purificación de estos. La purificación de las partículas virales se realizó por medio del kit ViraBind Adenovirus Miniprep Kit (Cell Biolabs Inc, San Diego CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez purificados los adenovirus se hicieron alícuotas de 150 µl y se almacenaron a -80°C para su posterior uso.

Aislamiento de células de bazo

Para determinar si los adenovirus recombinantes son capaces de despertar una respuesta inmune celular se llevaron a cabo ensayos de producción de IFN- γ con células de bazo de ratones inmunizados. Para esto se utilizaron ratones hembra de 6-8 semanas de la cepa C57BL/6 de la compañía Harlan, México, divididas en grupos de 3 ratones por cada tratamiento. Se inyectaron vía i.p. con 5×10^{10} partículas virales (P.V.) en un volumen final de 100 μ l en PBS estéril sin Calcio o Magnesio. Una semana post-infección se obtuvieron los bazos, se maceraron en un Cell Streiner (BD Pharmigen) con el émbolo de una jeringa, se realizaron lavados con medio de cultivo RPMI (Gibco, USA) y se resuspendieron las células en solución de potasio-cloruro de amonio para eliminar los eritrocitos, transcurridos tres minutos a temperatura ambiente se añadieron 20 ml de medio para detener la lisis. Las células se centrifugaron y resuspendieron en 10 ml de medio RPMI y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% por 40 min. Posterior a la incubación se determinó la viabilidad de las células por exclusión con azul tripano.

Cuantificación de los niveles de liberación de IFN gamma de los linfocitos en cultivo

Las células de bazo obtenidas fueron sembradas en cajas de cultivo de 24 pozos con 5×10^6 células por pozo, se les adicionó el péptido RAHYNIVTF (GenScript Corp, USA) de la proteína E7, el cual ya está demostrado que induce una respuesta inmune celular; también se les adicionaron 10 U de IL-2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) y a las 72 horas de cultivo se midieron los niveles de interferón gamma en los sobrenadantes

mediante un kit de Elisa (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los niveles de IFN- γ se analizaron en un lector de ELISA a 450nm.

Análisis de la capacidad lítica de los linfocitos contra células que expresen E7

Para esto se sembraron 5×10^6 linfocitos por pozo en cajas de 24 pozos y se les adicionó el péptido (RAHYNIVTF) de la proteína E7, también se les adicionó IL-2 y se mantuvieron en cultivo por 7 días; posteriormente se pusieron a co-cultivar por 4 horas con células TC-1 en relaciones 1:1, 1:3, 1:9 en placas de 96 pozos y se observó la capacidad lítica de los linfocitos indirectamente mediante la medición de la liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los pocillos por medio de un kit comercial (Promega Corp. USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La lisis específica se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

% de citotoxicidad= (Experimental-medio de cultivo)/ (máxima liberación LDH-medio de cultivo).

Ensayos de protección antitumoral

Para el experimento de protección antitumoral se utilizaron ratones de 6-8 semanas de edad, hembras, divididas en grupos de 6 ratones por cada tratamiento. Se retaron con 5×10^4 células TC-1 por ratón mediante una inyección subcutánea en el costado derecho. Tres días después se inyectaron vía i.p. con 5×10^{10} P.V. en un volumen final de 100 μ l en

PBS estéril sin Calcio o Magnesio y se repitió esta inmunización en el día 21 y 25 después de la inducción del tumor. Los adenovirus utilizados fueron el Ad-LacZ, el Ad-CRT/E7, Ad-CRT/E7m y el Ad-CRT/E7dm. El crecimiento tumoral se estuvo monitoreando cada tercer día y el volumen de los tumores se graficó con base a la fórmula volumen tumoral= ((diámetro menor)² (diámetro mayor))/2.

Para probar el efecto antitumoral de la construcción SP/E7/KDEL se inmunizaron 6 ratones de la cepa C57BL/6 con 5×10^{10} P.V. en un volumen final de 100 μ l en PBS estéril sin Calcio o Magnesio vía i.p. con los Ad-LacZ, Ad-E7, Ad-CRT/E7 y el Ad-SP/E7/KDEL. Una semana después se retaron con 5×10^4 células TC-1 por ratón mediante una inyección subcutánea en el costado derecho. El crecimiento tumoral se estuvo monitoreando cada tercer día y se graficó el volumen tumoral.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de las muestras se realizó con el programa SPSS v. 16 y se utilizó la prueba de ANOVA para comparar las diferencias entre tratamientos. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

Construcción de los adenovirus que codifican para las versiones de E7 mutantes del HPV-16 fusionadas a Calreticulina.

Construcción CRT/E7m. Para realizar la fusión de la Calreticulina a la versión de E7 mutante (CRT/E7m) se partió del plásmido BC219 que posee el gen de la E7 mutante, de aquí se amplificó y se clonó en el plásmido PCDNA3.1-CRT-E7. Posteriormente se amplificó la fusión CRT/E7m para clonarlo al vector transbordador pShuttle. En la Figura 7 se puede observar la secuencia génica de la fusión CRT/E7m en la cual se representa en color azul celeste la secuencia de la Calreticulina, en color morado la secuencia de E7 y en color rojo los sitios de restricción que los flanquean. En la Figura 8 se encuentra un esquema del plásmido pShuttle con el gen de la CRT/E7m integrado y la localización de los sitios de restricción *XhoI*, *EcoRV*, *ApaI*, *NotI*, *BamHI*, *PstI* y *EcoRI*, utilizados para la caracterización de las clonas positivas.

Construcción CRT/E7dm. Esta construcción (CRT/E7dm) se mandó sintetizar en la compañía GeneArt. De aquí se clonó en el vector pShuttle y como se observa en la Figura 10 al digerir las clonas positivas con las enzimas *BglIII* y *NotI* se observa que efectivamente liberan el inserto del tamaño adecuado (1.5 Kb) y una banda de 7 kB correspondiente al vector pShuttle. Adicionalmente se caracterizaron con otras enzimas de restricción para confirmar que dieran los patrones esperados.

CTCGAGATGCTGCTCCCTGTGCCGCTGCTGCTCGGCCTGCTCGGCCTGGCCGCCGCCGAGCCCGT
 CGTCTACTTCAAGGAGCAGTTTCTGGACGGAGATGGGTGGACCGAGCGCTGGATCGAATCCAAA
 CACAAGTCCGATTTTGGCAAATTCGTCTCAGTTCGGGCAAGTTCTACGGCGATCAGGAGAAAG
 ATAAAGGGCTGCAGACCAGCCAGGACGCCCGCTTCTACGCCCTGTCGGCCCGATTTCGAGCCGT
 CAGCAACAAGGGCCAGCCACTGGTGGTGCAGTTCACCGTAAACACGAGCAGAACATTGACTG
 CGGGGGCGGCTACGTGAAGCTGTTTCCGGCCGGCCTGGACCAGAAGGACATGCACGGGGACTCT
 GAGTACAACATCATGTTTGGTCTGACATCTGTGGCCCCGGCACCAAGAAGGTTTCACGTCATCTT
 CAACTACAAGGGCAAGAACGTGCTGATCAACAAGGACATCCGTTGCAAGGACGACGAGTTCAC
 ACACCTGTACACGCTGATCGTGGCCCGGACAACACGTATGAGGTGAAGATTGACAACAGCCAG
 GTGGAGTCGGGCTCCCTGGAGGATGACTGGGACTTCTACCCCCAAGAAGATAAAGGACCCAG
 ATGCCTCGAAGCCTGAAGACTGGGACGAGCGGGCCAAGATCGACGACCCACGGACTCCAAGC
 CCGAGGACTGGGACAAGCCCGAGCACATCCCCGACCCGGACGCGAAGAAGCCCGAAGACTGGG
 ACGAAGAAATGGACGGAGAGTGGGAGCCCGCGGTGATTCAGAACCCCGAGTACAAGGGTGAGT
 GGAAGCCGCGGCAGATCGACAACCCCGATTACAAAGGCACCTGGATCCACCCCGAAATCGACA
 ACCCCGAGTACTCGCCGACGCTAACATCTATGCCTACGACAGCTTTGCCGTGCTGGGCTTGAC
 CTCTGGCAGGTCAAGTCGGGCACCATCTTCGACAACCTTCTCATCAACGATGAGGCGTACG
 CAGAGGAGTTTGGCAACGAGACGTGGGGCGTACCAAGACGGCCGAGAAGCAGATGAAAGACA
 AGCAGGACGAGGAGCAGCGGCTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGAAGAAGCGGAAGGAGGAGGA
 GGAGCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 GACAAGGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
 GCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTC
 TACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGAC
 AAGCAGAACCGACAGAGCCATTACAATATTGTAACCTTTGGTTGCAAGTGTGACTCTACGCT
 TCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTTGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACA
 CTAGGAATTGTGGGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAAGATATC

Figura 7. Secuencia del gen CRT/E7m. Se puede observar el gen de la Calreticulina en color azul, el gen E7 mutante en morado y en color rojo los sitios de restricción siguientes: *XhoI*, *EcoRI* y *EcoRV*, según su orden en el gen.

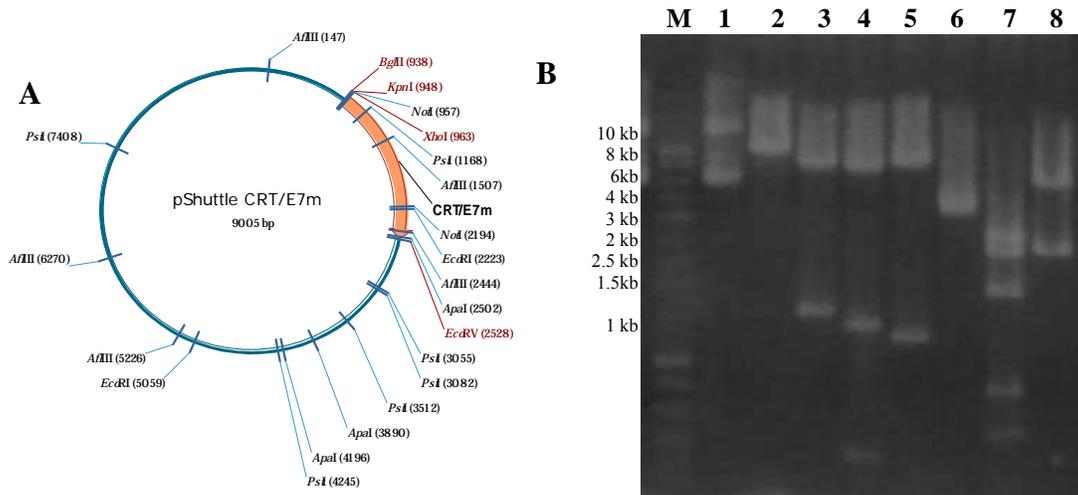


Figura 8. Construcción de la clona pShuttle: CRT/E7m. A) Esquema del plásmido pShuttle-CRT/E7m. B) Caracterización de una clona positiva donde se observan el carril 1 el plásmido superenrollado, en el carril 2 la linearización con *EcoRV*, en el carril 3 vemos la liberación de la banda de 1.5 Kb producto de la digestión con *XhoI* y *EcoRV*, en el carril 4 vemos el producto de la digestión con la enzima *ApaI* y en los carriles 5,6,7 y 8 vemos el resultado de las digestiones con *NotI*, *BamHI*, *PstI* y *EcoRI*, respectivamente.

AGATCTGCCACCATGCTGCTGCCCGTGCCCTGCTGCTGGGCCTGCTGGGACTGGCCGCTGCCG
 AGCCCGTGGTGTACTTCAAAGAACAGTTCTCGGACGGCGACGGCTGGACCGAGAGATGGATCGA
 GAGCAAGCACAAGAGCGACTTCGGCAAGTTCGTGCTGTCCAGCGGCAAGTTCTACGGCGACCAG
 GAAAAGGACAAGGGCCTGCAGACCAGCCAGGACGCCAGGTTCTACGCCCTGAGCGCCAGATTC
 GAGCCCTCAGCAACAAGGGCCAGCCTCTGGTGGTGCAGTTCACCGTGAAGCACGAGCAGAACA
 TCGACTGTGGCGGCGGATACGTGAAGCTGTTCCCTGCCGGCCTGGACCAGAAGGATATGCACGG
 CGACAGCGAGTACAACATCATGTTCCGGCCCCGACATCTGCGGCCCTGGCACCAAGAAAGTGCAC
 GTCATCTTCAACTACAAGGGCAAGAACGTGCTGATCAACAAGGACATCAGGTGCAAGGACGAC
 GAGTTCACCCACCTGTACACCCTGATCGTGAGGCCCGACAACACCTACGAGGTGAAGATCGACA
 ACAGCCAGGTGGAGAGCGGCAGCCTGGAAGATGACTGGGACTTCCTGCCCCCAAGAAGATCA
 AGGACCCCGACGCATCTAAACCCGAAGATTGGGATGAGAGGGCCAAGATCGACGACCCACCCG
 ACTCAAACCAGAAGATTGGGATAAGCCTGAGCACATCCCCGACCCTGACGCCAAGAAGCCAG
 AGGATTGGGACGAAGAGATGGACGGCGAGTGGGAGCCCCCTGTGATCCAGAACCCCGAGTACA
 AGGGCGAGTGGAAGCCTAGGCAGATCGATAACCCTGATTACAAGGGCACCTGGATCCACCCCG
 AGATCGACAATCCCGAGTACAGCCAGACGCCAACATCTACGCCTACGACAGCTTCGCCGTGCT
 GGGCCTGGACCTGTGGCAGGTCAAGTCCGGCACCATCTTCGACAACCTTCTGATCACCAACGAC
 GAGGCCTACGCCGAAGAGTTCGGCAACGAGACCTGGGGCGTGACCAAGACCCGCCGAGAAGCAG
 ATGAAGGACAAGCAGGACGAGGACGAGGCTGAAAGAAGAGGAAGAGGAAAAGAAGCGCAA
 AGAGGAAGAAGAGGCTGAAGAGGACGAAGAAGATAAGGACGACAAAGAGGATGAGGACGAGG
 ACGAAGAGGACAAAGACGAGGAAGAAGAAGAAGCCCGCTGGCCAGGCCAAGGACGAGCTG
ACGCGTATGCACGGCGATACCCCCACCCTGCACGAGTACATGCTGGACCTGCAGCCGAGACCA
 CCGACCTGTACCAGCTGAACGACAGCAGCGAGGAGGAGGACGAGATCGACGGCCCTGCCGGCC
 AGGCCGAGCCGACAGGGCCCACTACAACATCGTGACCTTCGGCTGCAAGTGCAGACAGCACCT
 GAGGCTGTGCGTGCAGAGCACCCACGTGGACATCAGGACCCTGGAGGACCTGCTGATGGGCACC
 CTGGGCATCGTGGGCCCATCTGCAGCCAGAAGCCCTG**AGCGGCCG**C

Figura 9. Secuencia del gen CRT/E7dm. Se observa en color rojo las secuencias de los sitios de restricción introducidos para realizar las clonaciones y en color naranja la secuencia Kozak introducida; en color celeste se observa la secuencia de la Calreticulina y en morado la secuencia de la E7 doble mutante.

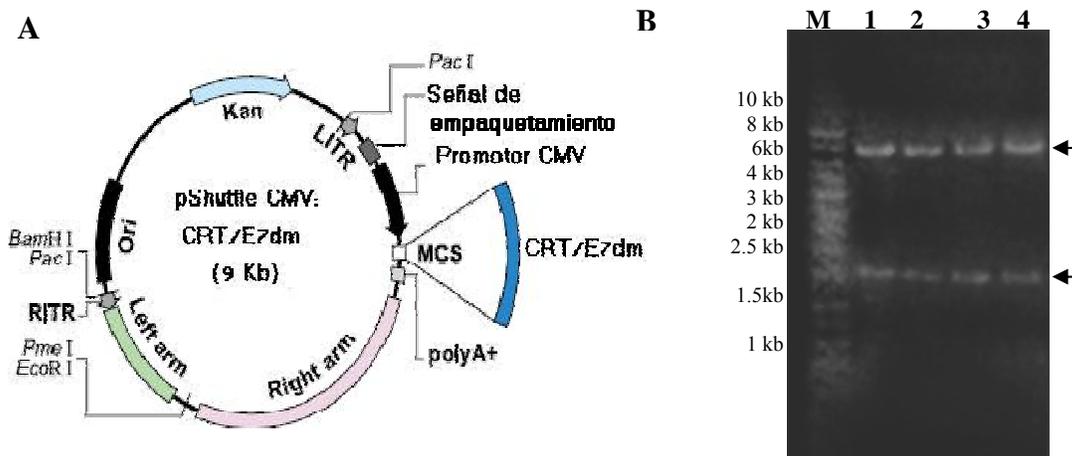


Figura 10. Plásmido pShuttle: CRT/E7dm. A) Esquemática del plásmido acarreador pShuttle donde se clonó el gen CRT/E7dm en los sitios *Bgl*II y *Not*I. B) Clonas de la ligación que liberaron el inserto del tamaño esperado al ser digeridas con *Bgl*II y *Not*I (carriles 2-5); primer carril, marcador de peso molecular.

Para la obtención del genoma adenoviral se transformaron células BJ5183 con el vector adenoviral (AdEasy) el cual posee el gen de resistencia a ampicilina; luego de seleccionar las clonas que contenían este plásmido se crecieron en gran cantidad para hacerlas calcio competentes y se transformaron por choque térmico con el vector pShuttle linearizado, el cual posee el gen de resistencia a kanamicina (Figura 11A); durante la recombinación se pierde el gen de resistencia a ampicilina del AdEasy y se seleccionaron por resistencia a kanamicina.

En la Figura 11B se muestran las clonas positivas, las cuáles se reconocen mediante la liberación de un fragmento de 3 o 4.5 Kb al ser digeridas con la enzima *PacI*, dependiendo si la recombinación se realizó en el ORI o en el brazo izquierdo de recombinación, lo cual en cualquiera de los casos, nos muestra que la recombinación se realizó de manera exitosa. En la Figura 12 se muestra un ejemplo para la caracterización con las enzimas *ClaI*, *BamHI* y *MluI* para una de las clonas del adenovirus CRT/E7dm. En los carriles 1, 3 y 5 se encuentra el genoma adenoviral sin recombinar AdEasy digerido con las enzimas *ClaI*, *BamHI*, y *MluI*, respectivamente, y en los carriles 2, 4 y 6 se encuentra una de las clonas con el genoma del adenovirus recombinado que introdujeron nuestro gen de interés, cambiando el patrón de restricción al digerirla con las enzimas antes mencionadas. Lo mismo se realizó para el adenovirus CRT/E7m.

Para la obtención de las partículas virales la transfección de los adenovirus se realizó en la línea celular HEK293, la cual expresa de manera constitutiva el gen E1A que se encuentra deletado en el genoma adenoviral y es necesario para la producción de las

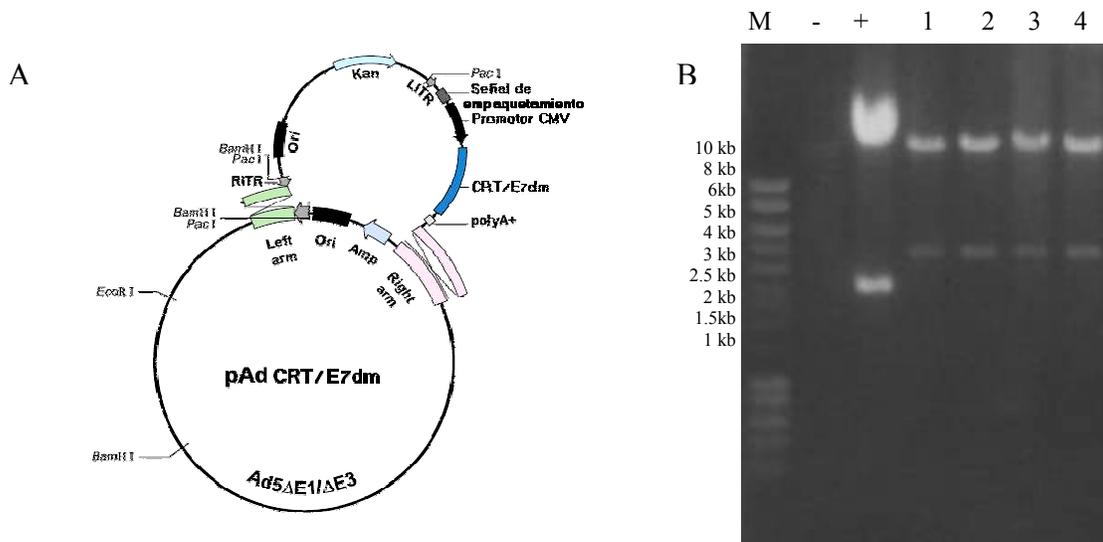


Figura 11. Recombinación homóloga para la obtención del genoma adenoviral. A) En este esquema se representan los sitios de recombinación homóloga entre el plásmido acarreador pShuttle y el genoma adenoviral AdEasy. B) Gel de Agarosa donde se observa la digestión con la enzima *PacI* de los plásmidos AdEasy, en carril (-), Ad-GFP, en carril (+) y en los carriles 1 a 4 las clonas del Ad-CRT/E7dm.

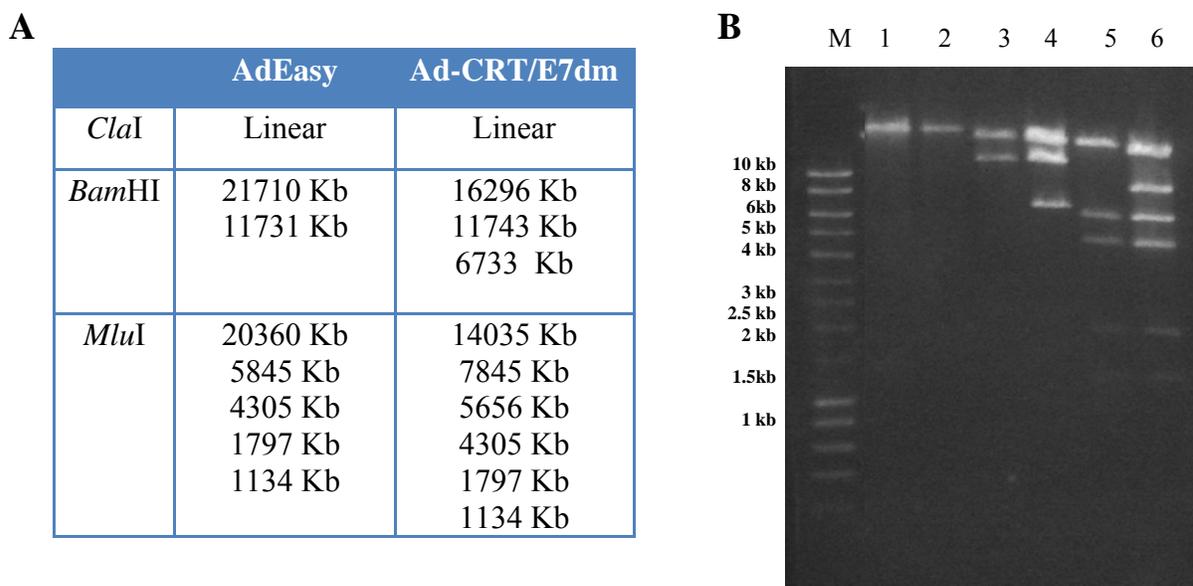


Figura 12. Caracterización Adenovirus CRT/E7dm. A) En esta tabla se muestra el patrón de bandas correspondiente a la caracterización con las enzimas *Clal*, *BamHI* y *MluI* y el patrón de bandas esperado con cada una, tanto para el Ad-CRT/E7dm (carriles 2, 4 y 6) como para el AdEasy (carriles 1, 3 y 5).

partículas virales. Una vez transfectadas se observaron las células diariamente en busca de que apareciera un efecto citopático el cual consiste en células redondeadas con núcleos prominentes como se muestra en la Figura 13; estos cambios en la morfología de las células nos indica que las células están produciendo partículas virales y que al lisarse se liberarán al medio de cultivo e infectarán a más células vecinas. Como control de la transfección se utilizó el Ad-GFP y la expresión del gen de la proteína verde fluorescente se muestra en la Figura 13C. Una vez observado un CPE completo se procedió a levantar las células y preparar un extracto crudo para infectar más células y para producir una mayor cantidad de virus para los siguientes experimentos.

El número aproximado de partículas virales presentes en los extractos crudos que se obtuvieron de la amplificación viral a pequeña escala se determinó incubando células HEK293 con diferentes cantidades de extracto crudo a probar. Los cultivos se monitorearon hasta observar la menor cantidad de virus que fue necesaria para obtener un efecto citopático completo a las 72 h, que, como se observa en la Figura 14, fue con 20 μ l lo cual corresponde a un MOI de 10. El experimento se repitió para todos los extractos crudos.

Para los experimentos de los siguientes objetivos se utilizó el Ad-LacZ (*lacZ* codifica para la enzima β -D-galactosidasa) como control negativo, por lo cual se procedió a analizar su funcionalidad; para esto se infectaron células HEK293 con una alícuota de este adenovirus purificado y se realizó una producción a pequeña escala. A las 48 h se adicionó X-Gal a los pozos para detectar la actividad enzimática. En la Figura 15 se observa el resultado de este experimento comprobándose con esto la funcionalidad del adenovirus control LacZ.



Figura 13. Efecto Citopático. Fotomicrografía donde se muestra un cultivo de células HEK293 antes de ser infectada con el Ad-GFP (A) y 72 horas después de la infección (B) mostrando los cambios característicos del efecto citopático. C) Micrografía de Fluorescencia mostrando una buena eficiencia de transfección (100X).

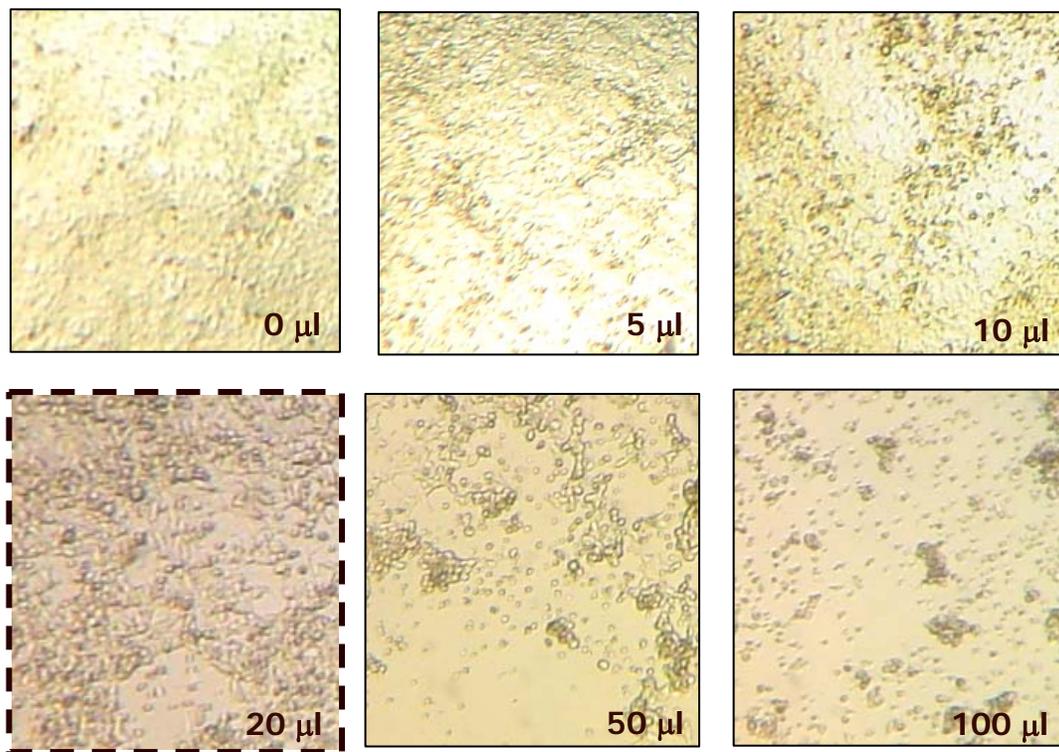


Figura14. Ensayo de MOI para HEK293. En esta Figura se muestra el efecto citopático observado a las 72 horas de infección con el Ad-GFP con distintas cantidades de extractos crudos en la línea celular HEK293 (40X).

Los adenovirus producidos son capaces de dirigir la expresión de las proteínas recombinantes CRT/E7m y CRT/E7dm

Para realizar este ensayo se sembraron células SiHa y se infectaron con el Ad-CRT/E7m y el Ad-CRT/E7dm y el Ad-GFP como control negativo, así también se dejó un pozo con células sin infectar como otro control negativo de la línea celular. A las 72 horas se realizaron los extractos de proteínas totales y se realizó una cuantificación de proteínas por el método de Bradford y utilizando la proteína Gamma Globulina Bovina para preparar los estándares y la curva de calibración (Figura 16 A).

Una vez determinada la concentración de los extractos se cargaron 40 μ g en un gel de Acrilamida-SDS al 12% y una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, ésta se incubó con el anticuerpo primario anti-E7 y anti- β -actina como control de carga, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a HRP.

En la Figura 16B se muestra la detección de la expresión tanto de la proteína de fusión CRT/E7m como la CRT/E7dm, ambas con el mismo peso molecular que es de aprox. 75 kDa, ya que la Calreticulina por si sola corre alrededor de 60 kDa y la proteína E7 a 15 kDa. Con esto concluimos que los adenovirus construidos son capaces de dirigir la expresión de los transgenes que clonamos en sus genomas.

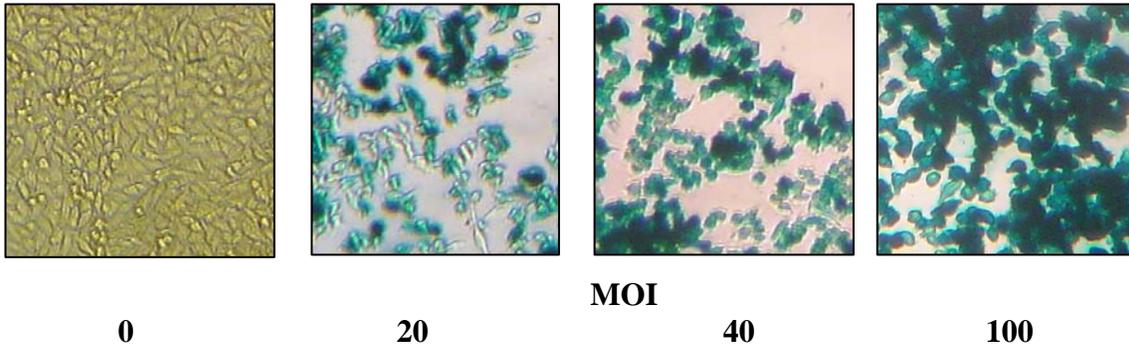


Figura 15. Tinción de X-Gal para el Ad LacZ. Para este experimento se infectaron células HEK293 con el Ad-LacZ para comprobar su funcionalidad a MOIs de 0, 20, 40 y 100 (40X).

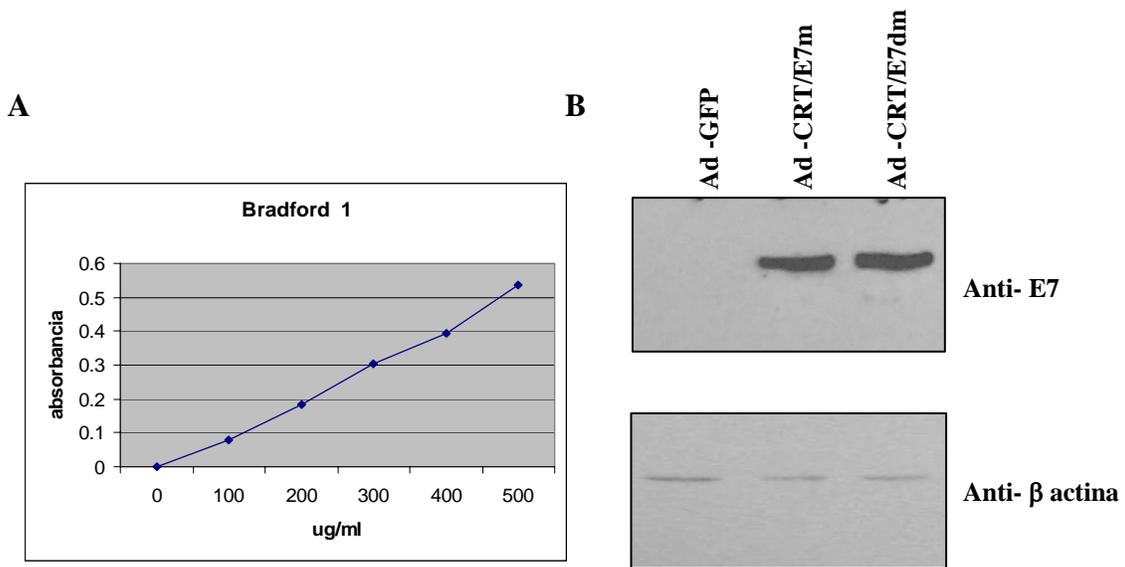


Figura 16. Detección de las proteínas recombinantes. A) y B) Curva de los estándares de proteínas para hacer el ensayo de Bradford en microplaca C) Western Blot de extractos proteicos de células HEK293 infectados con el Ad-GFP, Ad-CRT/E7m y Ad-CRT/E7dm para la detección de las proteínas recombinantes con anticuerpos específicos contra E7 y detección de la β actina como control de carga.

Los antígenos E7 mutante y doble mutante fusionados a Calreticulina son expresados en Retículo Endoplásmico

En previos estudios se había reportado que al fusionar al antígeno E7 a la proteína Calreticulina, este antígeno se dirigía al retículo endoplásmico, que es el sitio donde la Calreticulina normalmente reside, a diferencia del antígeno E7 silvestre que reside en núcleo y citoplasma por lo que en este experimento buscamos ver cuál es la localización celular de las proteínas mutantes fusionadas a Calreticulina. Para esto se estandarizó la técnica de inmunofluorescencia tanto con el anticuerpo anti- Calnexina, producido en conejo, como con el anticuerpo anti- β actina, producido en ratón, posteriormente se incubaron con dos anticuerpos secundarios con un fluoróforo distinto para cada anticuerpo primario (anti IgG de conejo conjugado a Alexa fluor 488-verde, y anti IgG de ratón conjugado a Alexa fluor 595-rojo). Esto con el fin de analizar que la señal de Calnexina fuera específica de retículo endoplásmico y no de citoplasma (Figura 17).

Una vez establecido el sistema se analizaron los adenovirus de interés, esta vez se utilizó el mismo anticuerpo anti-Calnexina pero ahora en combinación con un anticuerpo anti-E7 producido en ratón, observando la señal emitida en color rojo. En la Figura 18 se puede observar que tanto en las células infectadas con el adenovirus CRT/E7, como con el CRT/E7m y CRT/E7dm la señal de E7 se co-localizó con la señal en verde de la Calnexina, indicándonos que en todas las fusiones el antígeno E7 está siendo expresado en retículo endoplásmico.

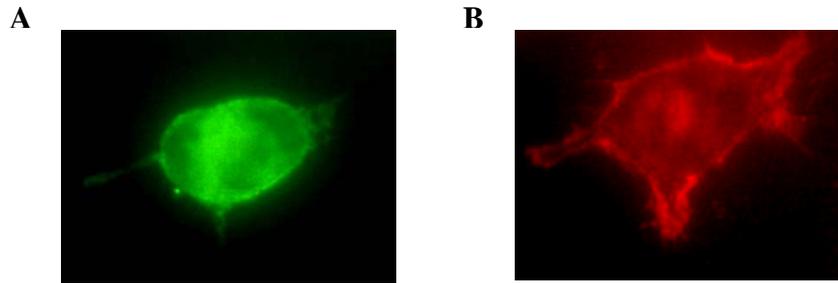


Figura 17. Localización celular del marcador Calnexina. En esta figura se observa la señal en retículo endoplásmico de la proteína Calnexina en color verde (A), y en color rojo, la proteína β -actina delimitando el contorno celular (B).

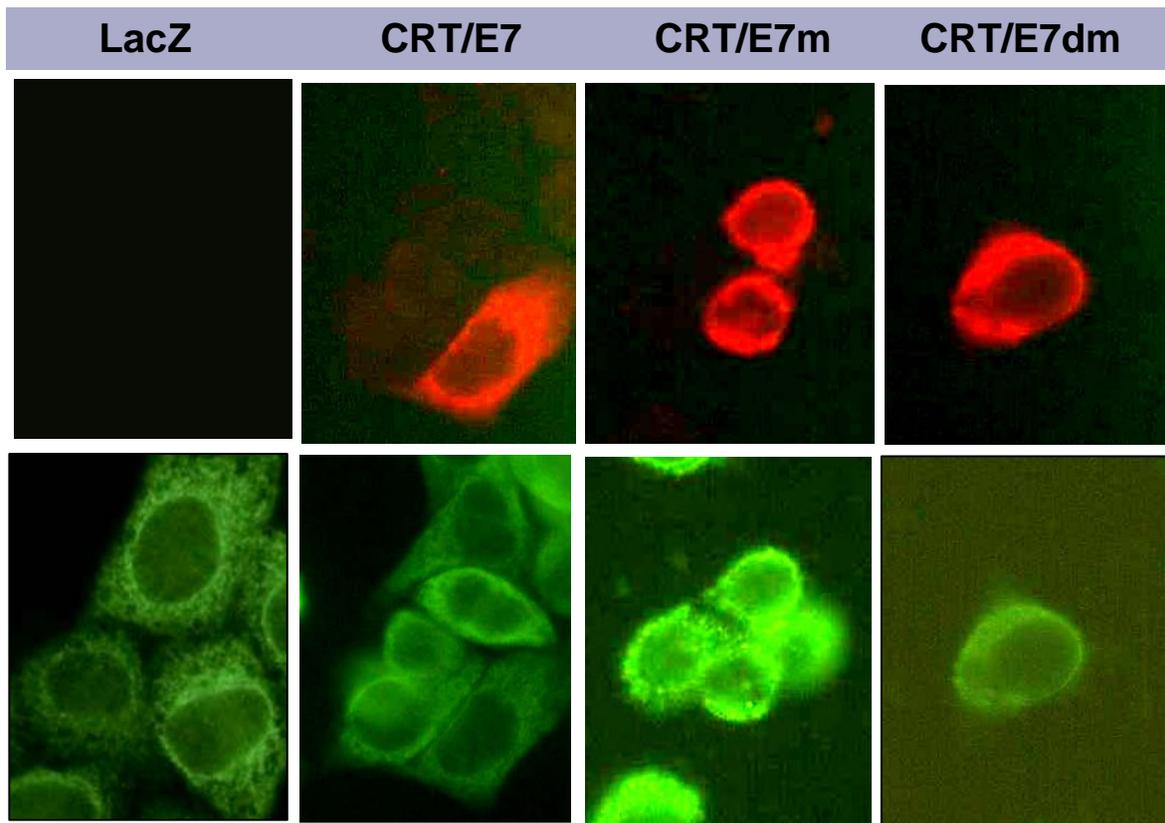


Figura 18. Localización de las proteínas E7 mutantes fusionadas a Calreticulina. En el panel superior se encuentra el nombre del adenovirus con el que se infectó cada columna de células; en la primera fila en color rojo se observa la expresión del antígeno E7 en color rojo, y en la segunda fila se observa la expresión del marcador de retículo endoplásmico, Calnexina, en color verde (100X).

Una vez detectada la expresión y localización de las proteínas recombinantes el siguiente paso fue la producción a gran escala de los adenovirus para tener suficiente cantidad y realizar los ensayos de protección antitumoral. La purificación de las partículas virales se realizó por medio de un kit comercial basado en la captación de los virus por medio de las proteínas de su cápside en filtros especiales, por lo cual no es necesaria la ultra-centrifugación en gradientes con cloruro de cesio. Una vez purificados los adenovirus se calculó su concentración basándonos en su absorbancia a 260 nm. En la Tabla 1 se muestra la concentración de los diferentes adenovirus las cuales caen en un rango de entre $1-2.5 \times 10^{12}$ Partículas Virales (P.V.)/ml.

El antígeno E7 doble mutante fusionado a Calreticulina confiere un mejor efecto antitumoral que el antígeno E7 mutante o las versiones silvestres

Para comparar el efecto antitumoral de las versiones mutantes de E7 fusionadas a Calreticulina se realizó un experimento en el cual se inyectaron células TC-1 en ratones C57BL/6 para posteriormente ser inmunizados con los diferentes adenovirus. Como se puede observar en la Figura 19 los ratones que recibieron el tratamiento con el Ad-CRT/E7 tuvieron un crecimiento tumoral menor que los ratones inmunizados con el Ad-LacZ pero no fue significativo. Por otro lado, tanto con el Ad-CRT/E7m como con el Ad-CRT/E7dm, redujeron significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el control Ad-LacZ. Con estos resultados podemos concluir que las versiones mutantes fusionadas a Calreticulina poseen una doble ventaja frente a la versión silvestre ya que no posee capacidad transformante y además mejoran el efecto antitumoral en el modelo murino.

Tabla 1. Concentración de los Adenovirus Purificados. En esta tabla se encuentra el resultado de la cuantificación de las partículas virales de cada muestra.

Adenovirus	Concentración (PV/ml)
LacZ	1.21×10^{12}
E7	1.65×10^{12}
CRT/E7	1.98×10^{12}
CRT/E7m	2.51×10^{12}
CRT/E7dm	2.1×10^{12}

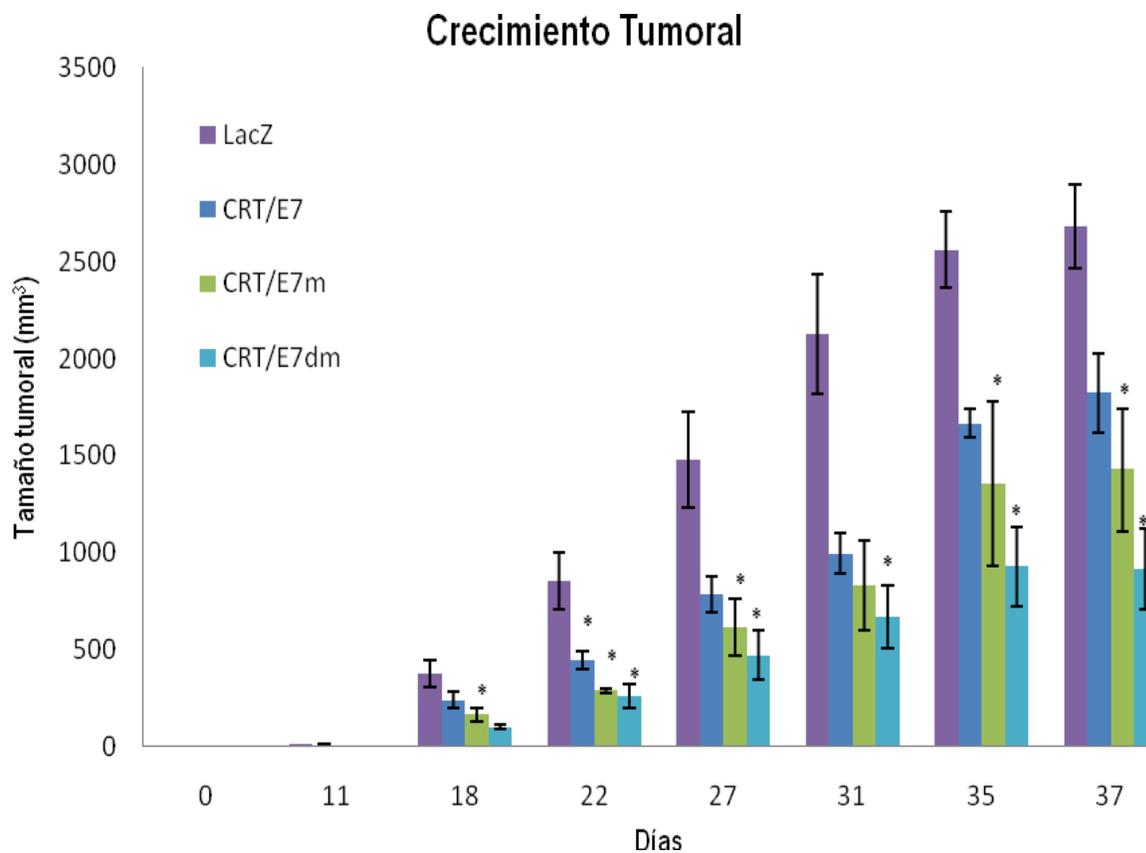


Figura 19. Ensayo terapéutico. En esta figura se muestra el crecimiento tumoral con respecto al tiempo en los ratones C57BL/6 inmunizados con los distintos tratamientos. * $P < 0.05$ con respecto al grupo inmunizado con el Ad-LacZ.

Análisis del efecto antitumoral de una versión del antígeno E7 fusionada a las señales de envío y retención al retículo endoplásmico de la Calreticulina

Construcción SP/E7/KDEL. Para la construcción del gen SP/E7/KDEL se amplificó con la enzima *Pfx* (Invitrogen Corp., USA) el gen E7 a partir del plásmido PCDNA3.1 CRT/E7 y se le adicionó el péptido señal de la Calreticulina y la señal de retención en retículo KDEL (Figura 20) por medio de dos primers. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1.2%, se purificó y se clonó en el vector Topo 2.1; las clonas resistentes a ampicilina fueron caracterizadas con enzimas de restricción y secuenciadas. Posteriormente se digirió tanto el vector Topo 2.1 con el gen de interés insertado en el sentido correcto, así como el vector pShuttle con las enzimas *BglIII* y *HindIII* para clonar el gen SP/E7/KDEL en este. Las clonas se seleccionaron por su resistencia a kanamicina y se caracterizaron mediante digestión con enzimas de restricción así como por PCR. En la Figura 21 se observa el resultado de la caracterización con la enzima *HindIII*, en donde vemos que el patrón es el esperado, el cuál está señalado en la tabla de esta misma figura. Una vez caracterizado se produjeron las partículas virales por el mismo procedimiento antes descrito para los adenovirus CRT/E7m y CRT/E7dm.

Los adenovirus producidos son capaces de dirigir la expresión de la proteína recombinante SP/E7/KDEL

Para la detección de la proteína que codifica el transgen SP/E7/KDEL se estuvieron probando diferentes condiciones, ya que no lográbamos detectar la proteína recombinante

GGTACCATGCTGCTCCCTGTGCCGCTGCTGCTCGGCCTGCTCGGCCTGGCCGCCGCCCTG
 CATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATC
 TCTACTGTTATGAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAG
 CTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGA
 CTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGACATTCGTACTTTGGAAGACCTG
 TTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCCATCTGTTCTCAGAAACCAAGGACGAGCTGT
 AGAAGCTT

Figura 20. Secuencia de la Fusión SP/E7/KDEL. Se observa en color rojo las secuencias de los sitios de restricción *Bgl*II y *Hind*III introducidos para realizar las clonaciones y en color celeste se observa la secuencia del péptido señal y en morado la secuencia KDEL.

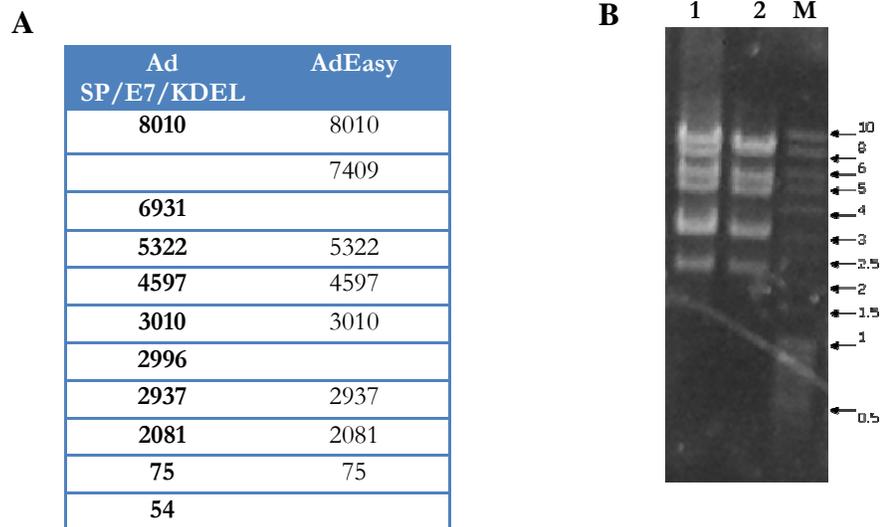


Figura 21. Caracterización del Ad-SP/E7/KDEL. En esta figura se muestra la caracterización del adenovirus con la enzima *Hind*III, en la tabla se muestran las bandas que resultan y en la foto del gel de agarosa se muestra el patrón de corrimiento (A) comparándolo con el control AdEasy (B).

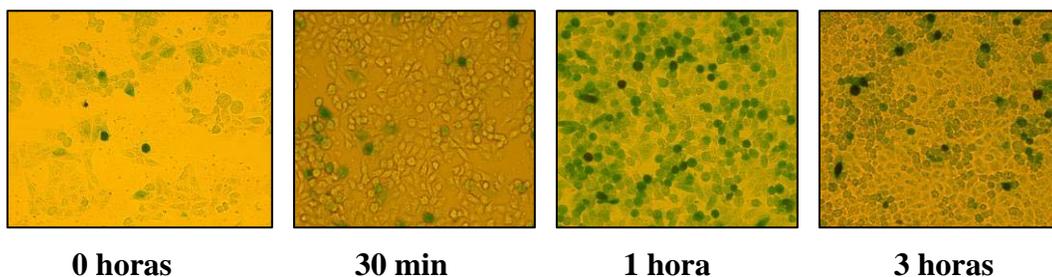


Figura 22. Efecto del inhibidor de proteosoma Calpain I. En esta figura se observa el resultado de la tinción realizada con el Ad-LacZ para observar el efecto del inhibidor Calpain I a distintos tiempos de incubación (20X).

mediante la técnica de rutina ya que de acuerdo con la literatura, la proteína E7 silvestre es muy inestable (Fiedler *et al*, 2004). Finalmente se optó por trabajar con un coctel inhibidor de proteasas y el inhibidor de proteosoma Calpain Inhibitor I a una concentración de 30µg/ml. Para utilizarlo se estandarizó el tiempo óptimo de la máxima acumulación de proteína con el Ad-LacZ. Como se muestra en la Figura 22, después de una hora fue cuando se alcanzó el pico máximo de acumulación de proteína. Este experimento se realizó por duplicado observándose resultados similares.

Una vez determinado el tiempo de acumulación máxima, se realizó el experimento para la detección de la proteína recombinante SP/E7/KDEL y como se observa en la Figura 23 se detectó la expresión de la proteína del control positivo Ad-CRT/E7 a 70 kDa aprox. y el adenovirus Ad-SP/E7/KDEL expresó la proteína a 15 kDa aprox.

El antígeno SP/E7/KDEL es expresado en Retículo Endoplásmico

Para comprobar que el antígeno E7 estaba siendo dirigido y retenido en el retículo endoplásmico se llevó a cabo un ensayo de inmunofluorescencia en donde células HEK293 fueron infectadas con los adenovirus Ad-LacZ, Ad-E7, Ad-CRT/E7 y Ad-SP/E7/KDEL. Como se observa en la Figura 24, en el tratamiento con el Ad-LacZ no hay expresión de E7, solo se observa la expresión de la proteína Calnexina en color verde, en cambio con el Ad-E7 se observa que la señal de E7, en color rojo, no se sobrelapa con la señal de la Calnexina, en color verde, ya que la localización de la proteína silvestre es principalmente

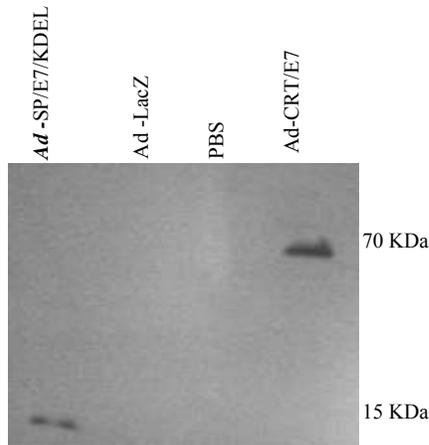


Figura 23. Detección de la expresión de la proteína recombinante SP/E7/KDEL. En esta figura se la expresión de la proteína E7 en células infectadas con el adenovirus PS/E7KDEL, así como el control positivo CRT/E7.

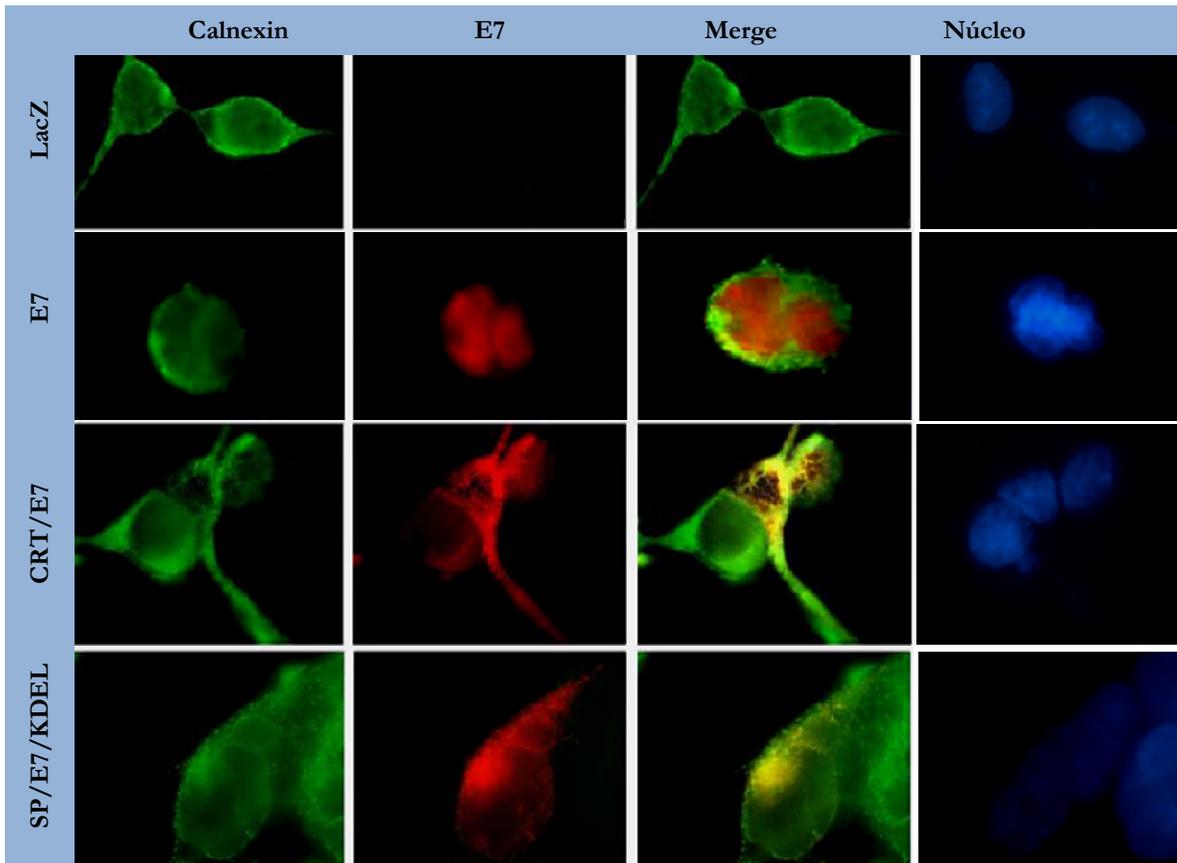


Figura 24. El antígeno SP/E7/KDEL es expresado en retículo endoplásmico. En la primera columna en color verde se observa la expresión del marcador de retículo endoplásmico, Calnexina; en la segunda columna se observa la expresión del antígeno E7 en color rojo, en la tercera fila se observa el sobrelapamiento de las imágenes de las señales de E7 y Calnexina y en la última fila se observa la señal en azul del material genético evidenciado mediante el reactivo DAPI (100X).

nuclear. Con el Ad-CRT/E7 la señal de E7 se co-localiza con la señal de RE en verde y este mismo patrón lo sigue el Ad-SP/E7/KDEL con lo que se comprueba que las señales que posee son funcionales y el antígeno está siendo enviado y retenido en RE.

La inmunización con el Ad-SP/E7/KDEL induce la expresión de IFN- γ

Como ya se ha reportado anteriormente, el Interferón(IFN)- γ es una citosina importante para la respuesta inmune celular, así como para la actividad citotóxica. Por esto se evaluó si la inmunización con el vector adenoviral Ad-SP/E7/KDEL podría inducir la expresión de IFN- γ . Como se observa en la Figura 25 los linfocitos de ratones inmunizados tanto con el Ad-CRT/E7 como con el Ad-SP/E7/KDEL generaron niveles significativos de IFN- γ cuando fueron estimulados con el péptido de E7: RAHYNIVTF. Además esta respuesta fue específica para E7 ya que los linfocitos de ratones inmunizados con el adenovirus control Ad-LacZ, o con el vehículo PBS, no generaron niveles significativos de IFN- γ . Este resultado indica que la inmunización con la fusión del antígeno E7 a las señales de envío y retención en RE aumenta la respuesta de células T así como la producción de citocinas.

La inmunización con el Ad SP/E7KDEL induce una actividad citotóxica en contra de células tumorales que expresan el antígeno E7 del HPV-16

Con el fin de evaluar de manera más completa la respuesta inmune celular realizamos un ensayo para determinar si los linfocitos de ratones inmunizados con los

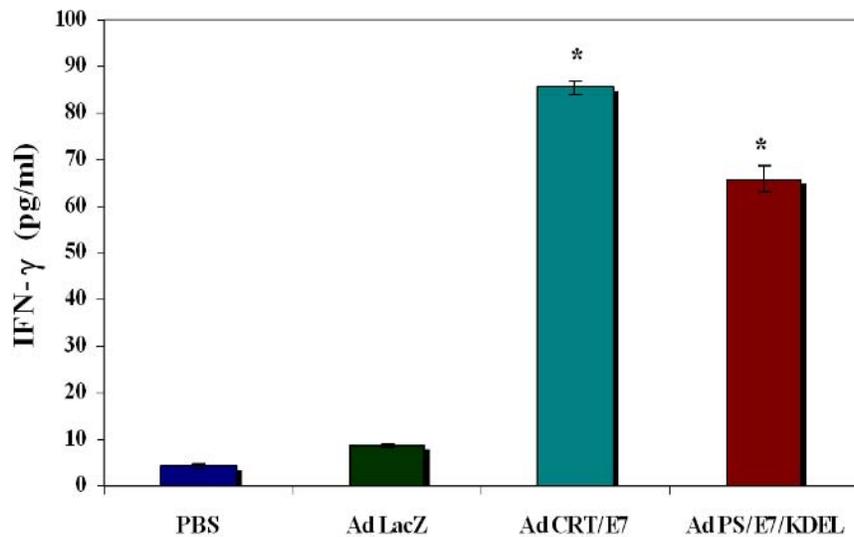


Figura 25. Niveles de IFN gamma en cultivo de linfocitos inmunizados. En esta figura se observa la liberación de IFN- γ por linfocitos de ratones inmunizados con los distintos tratamientos. Los niveles de liberación de IFN- γ por el Ad-CRT/E7 y el Ad-SP/E7/KDEL no tuvieron diferencia estadísticamente significativa entre ellas, pero si en comparación con los controles PBS y el Ad-LacZ. * $P < 0.05$.

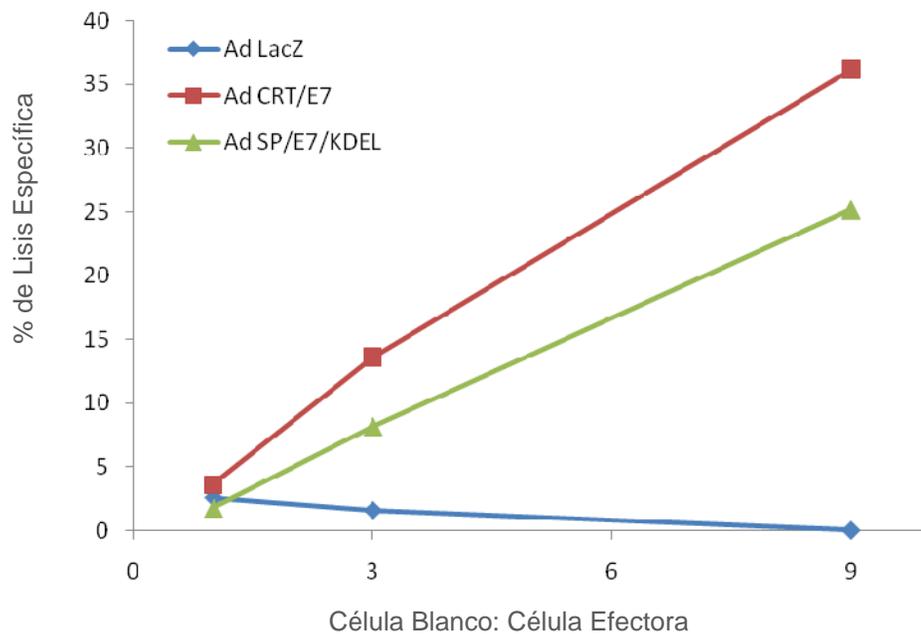


Figura 26. Ensayo de citotoxicidad. En esta figura se observan los resultados de la actividad lítica de las células de bazo co-cultivadas con células tumorales TC-1 en distintas proporciones célula blanco: célula efectora 1:1, 1:3, 1:6 y 1:9. Los datos son representativos de dos experimentos realizados.

diferentes adenovirus pueden inducir una citotoxicidad sobre células TC-1 que expresan el antígeno E7 del HPV. Para esto se aislaron linfocitos de ratones previamente inmunizados con los adenovirus y se estimularon *in vitro* con el péptido RAHYNIVTF en presencia de IL-2 por seis días para la expansión de células efectoras. Luego de esto se incubaron por 4 horas en presencia de células TC-1 y se midió la liberación al medio de cultivo de LDH por medio de un kit comercial. Como se puede observar en la Figura 27 tanto los linfocitos inmunizados con el Ad-CRT/E7 como el Ad-SP/E7/KDEL tuvieron una buena respuesta citotóxica, la cual fue específica contra E7 ya que el control Ad-LacZ no generó una citotoxicidad contra las células TC-1.

La adición de las secuencias Péptido Señal y KDEL al antígeno E7 aumentan su capacidad antitumoral

Puesto que el objetivo principal de la creación de esta vacuna es evaluar el efecto antitumoral en el modelo murino, se procedió a inmunizar a grupos de ratones vía i.p. con los diferentes adenovirus, una semana después se retaron con las células TC-1 y se monitoreó el crecimiento tumoral. Como se observa en la Figura 27 la inmunización con el Ad-SP/E7/KDEL generó un potente efecto antitumoral, lo cual se evidenció por la ausencia del crecimiento tumoral en el 100% de los ratones, en tanto que todos los ratones que recibieron la inmunización con el Ad-CRT/E7 desarrollaron un pequeño tumor que después de 4 semanas eliminaron. En contraste los ratones inmunizados con el Ad-E7 y el Ad-LacZ desarrollaron tumor. Con esto concluimos que el envío y retención del antígeno E7 en el RE genera una potente respuesta antitumoral.

Estos resultados sugieren que la inmunización con el antígeno SP/E7/KDEL es una excelente estrategia para generar una buena respuesta inmune antitumoral, además sugiere que gran parte de este efecto está siendo conferido por el envío del antígeno al RE y no por el efecto de la proteína Calreticulina *per se*.

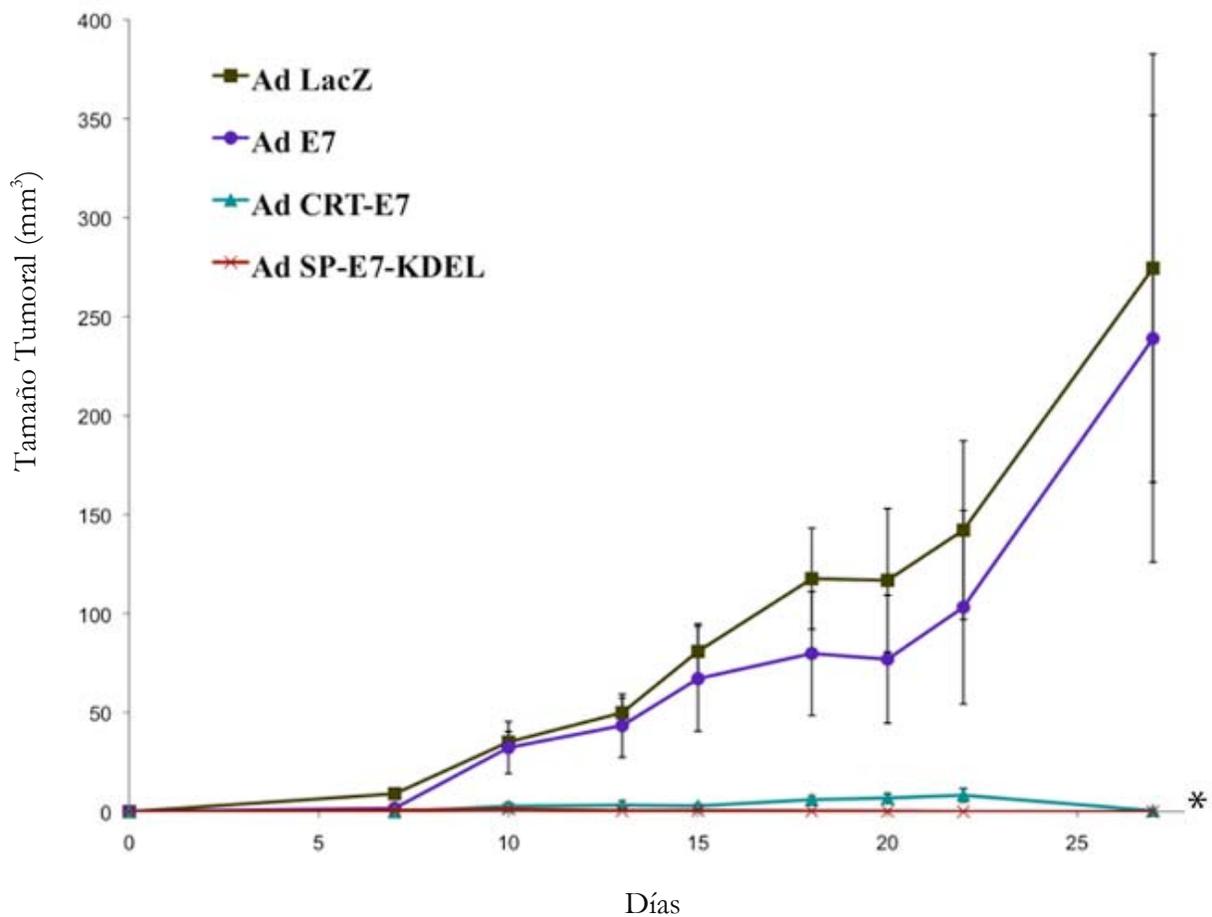


Figura 27. Efecto antitumoral del adenovirus SP/E7/KDEL. Grupos de seis ratones recibieron una inmunización con los distintos adenovirus y una semana después fueron retados con las células tumorales TC-1. En la gráfica se representa el promedio del crecimiento tumoral de cada grupo de ratones. La inmunización con el Ad-SP/E7/KDEL protegió contra el establecimiento del tumor en el 100% de los ratones. * $P < 0.05$ con respecto a los grupos Ad-LacZ y Ad-E7.

DISCUSIÓN

En la actualidad gran parte de la investigación está enfocada al estudio del cáncer y en especial al desarrollo de nuevas terapias que ayuden a la erradicación de esta enfermedad. En este trabajo se desarrollaron una serie de vacunas basadas en la tecnología llamada Terapia Génica dónde por medio de la inmunización con un vector, en este caso un adenovirus, se introduce material genético que dirige la expresión de antígenos inmunogénicos que estimulen al sistema inmune para despertar una respuesta inmune específica contra células tumorales que expresen estos antígenos.

Debido a que el cáncer cérvico uterino está íntimamente relacionado con la infección con HPV-16, las células cancerígenas expresan proteínas exclusivas del virus, lo que las diferencia de las células normales y convierte a estas proteínas en un blanco para dirigir una respuesta inmune antitumoral. De estas proteínas el antígeno E7 es una de las que se expresan en mayor cantidad en estadios avanzados de la enfermedad por lo que gran parte de la investigación para el desarrollo de vacunas antitumorales están basadas en el uso de éste, sin embargo posee capacidad transformante por sí mismo al ser capaz de unirse a la proteína supresora de tumores pRb a través de sus dominios conservados CR2 y CR3, por lo que su uso en humanos no es recomendable por el riesgo que conlleva de transformar tejido normal.

Por lo anterior en este trabajo nos avocamos a la tarea de desarrollar nuevas versiones del antígeno E7 sin capacidad transformante que tengan una buena capacidad antitumoral. Para esto partimos de un antecedente reportado por nuestro grupo de trabajo

(Gómez *et al*, 2007) en el cual se demostró que la inmunización con un adenovirus que expresa al antígeno E7 silvestre fusionado al potenciador de la respuesta inmune Calreticulina generaba una potente respuesta inmune antitumoral específica contra células TC-1 que expresan E7, lo anterior probado en un modelo murino.

Para mejorar esta vacuna una de las estrategias que probamos fue el uso de versiones de E7 sin capacidad transformante. Una de las versiones mutantes que analizamos es la reportada por Shi *et al*. 1999, la cual tiene mutaciones en las cisteínas 58 y 91. Estas mutaciones eliminan su oncogenicidad y rápidamente es degradada generando una mayor cantidad de epítopes para ser presentados en el contexto del MHCI. Con ello se mejoró la respuesta inmune antitumoral al ser probada en un modelo murino. En esta tesis se quiso estudiar el efecto de la inmunización con la fusión de esta versión mutante a Calreticulina ya que no sabíamos si al estar fusionada la Calreticulina volvería al antígeno más o menos estable y si esto repercutiría en su capacidad para despertar una respuesta inmune antitumoral. Además creamos una nueva versión doble mutante (E7dm) la cual además de las mutaciones en los aminoácidos 58 y 91 posee una delección en los aminoácidos 24 al 26, responsables de la unión a la proteína supresora de tumor pRb.

Debido a que estas versiones mutantes se probaron mediante terapia génica adenoviral, por ello el primer paso fue la construcción de los adenovirus que contuvieran los transgenes para la expresión de las proteínas de fusión CRT/E7m y CRT/E7dm. Una vez que se construyeron los adenovirus lo siguiente fue probar que efectivamente los adenovirus fueran capaces de dirigir la expresión de los transgenes. Para esto se infectaron

células con los adenovirus y se cargaron los extractos proteicos en geles de acrilamida para detectar las proteínas recombinantes mediante un Western blot. En la Figura 16 se puede observar el resultado del Western blot mostrándose dos bandas correspondientes a las proteínas de fusión CRT/E7m y CRT/E7dm. Éstas tienen un peso de aproximadamente 75 kDa, lo cual corresponde con el tamaño de las proteínas Calreticulina y E7 por separado, el cual es de 60 y 15 kDa respectivamente.

El siguiente objetivo específico fue investigar si el antígeno estaba siendo enviado al RE ya que la estrategia de fusionar los antígenos a la Calreticulina es dirigirlos hacia la vía MHCI y en el RE es donde se ensamblan los epítopes en estas moléculas, precisamente con ayuda de chaperonas como la Calreticulina. Como se observa en la Figura 18 tanto al infectar células con el Ad-CRT/E7m como con el Ad-CRT/E7dm la expresión del antígeno E7 fue en RE, esto se pudo constatar al co-localizarse la expresión con el marcador de RE, Calnexina, también se usó el Ad-CRT/E7 como control positivo, ya que anteriormente ya se había reportado (Gómez *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2001) que al fusionar el antígeno E7 a Calreticulina el antígeno era expresado en RE.

Una vez que demostramos que los adenovirus producidos eran capaces de dirigir la expresión de las proteínas recombinantes y que estas eran expresadas en el RE, el siguiente paso fue analizar su capacidad antitumoral en un modelo *in vivo*. Como podemos observar en la Figura 19 los ratones inmunizados con el Ad-CRT/E7m y el Ad-CRT/E7dm mostraron diferencia significativa con el grupo control Ad-LacZ después de los 22 días del reto con las células tumorales. En contraste el Ad-CRT/E7 no mostró diferencia

significativa en comparación con los controles, esto posiblemente por el esquema de inmunización, ya que el esquema en el que se había reportado el efecto del Ad-CRT/E7 era distinto (Gómez *et al*, 2007). Por lo anterior sería interesante seguir investigando el efecto antitumoral de los adenovirus con inmunizaciones más tempranas o con un reto con un número menor de células tumorales. Lo anterior para dar más tiempo de montar una buena respuesta antitumoral antes de que el tumor adquiriera un tamaño mayor y que sea más difícil de erradicar.

Durante el desarrollo de esta tesis nos planteamos un nuevo objetivo con el fin de determinar si la mayor parte de las propiedades antitumorales conferidas a la Calreticulina dependen de su habilidad para enviar y retener antígenos en el retículo endoplásmico (RE). Para esto creamos un adenovirus que expresa una nueva versión de E7 la cual lleva las señales requeridas para dirigirse al retículo endoplásmico (SP: MLLPVPL LLGLLLGLAAAL) y la señal de retención en RE (KDEL). De igual manera que con las construcciones anteriores se probó la expresión mediante Western blot, confirmándose que era expresado, esta vez con un peso molecular de 15 kDa aprox. También se determinó su localización demostrándose que estaba siendo expresado en RE, a diferencia de la E7 silvestre cuya expresión fue nuclear (Figura 24).

Posteriormente analizamos la respuesta inmune celular cuantificando los niveles de IFN- γ que expresaban los linfocitos de ratones inmunizados con estos adenovirus. Como observamos en la Figura 25 hubo una buena producción de IFN- γ comparable con el del

grupo inmunizado con el Ad-CRT/E7. Además demostramos que estos linfocitos tienen una citotoxicidad específica contra células que expresan el antígeno E7 (Figura 25).

Con los resultados anteriores podemos concluir que el efecto antitumoral atribuido a la Calreticulina es conferido, principalmente, por sus señales SP y KDEL, las cuales permiten que los antígenos entren y sean mantenidos en el RE. Aún cuando el mecanismo mediante el cual la generación de epítopes en el RE aún no es bien entendido, una posibilidad es que la secuencia KDEL puede provocar que los antígenos permanezcan más tiempo en este sitio, incrementando sus posibilidades de degradación y, como consecuencia, la generación de péptidos y su unión a moléculas MHC I.

En la literatura se encuentra reportado el efecto antitumoral del envío de epítopes inmunogénicos al RE por medio de una señal SP (Sherritt *et al*, 2001), sin embargo, el uso de un solo péptido queda restringido para personas con esa molécula en específico de HLA por lo cual sería mejor la inmunización con el antígeno completo (Toes *et al*, 1996). También se ha reportado que la fusión de este péptido con la señal KDEL genera un buen efecto antitumoral comparándolo con el péptido sin esta señal (Yin *et al*, 2009), pero de nuevo su uso queda conferido a un tipo de HLA en particular. Por todo lo anterior la construcción que aquí desarrollamos posee la ventaja de tratarse del antígeno completo y de esta manera cada célula podrá generar los epítopes inmunodominantes para su tipo de molécula de histocompatibilidad en particular. Basados en los reportes mencionados creemos que también valdría la pena determinar a futuro la contribución de la señal SP y

KDEL por sí mismas fusionadas al antígeno completo E7, y compararlas con el efecto de la fusión SP/E7/KDEL.

Otra ventaja del uso de esta estrategia sería prevenir cualquier efecto adverso que pudiera causar la sobreexpresión de la Calreticulina, por ejemplo, con su rol en el almacenamiento de Ca^{2+} intracelular (Michalak *et al*, 1999).

Se ha reportado que la fusión a Calreticulina también aumenta la respuesta a antígenos como el [PA(dIV)] de *Bacillus anthracis* (Park *et al*, 2008) y el coronavirus del SARS (Kim *et al*, 2004). Aún cuando el mecanismo de acción no se conoce, esperamos que nuestra estrategia también pueda potenciar la respuesta inmune contra este tipo de antígenos.

Con nuestros resultados se demuestra que el uso de las nuevas versiones mutantes de E7 del HPV-16 fusionadas a Calreticulina genera un mejor efecto antitumoral que empleando la versión silvestre de la misma. Lo anterior tiene un gran impacto ya que estas mutaciones eliminan la capacidad transformante que el antígeno E7 posee por sí mismo y esto es primordial para poder generar una vacuna con potencial uso terapéutico en humanos. Además, se demostró que la fusión de E7 a señales que lo envíen y retengan en retículo endoplásmico le confieren el mismo efecto antitumoral que al fusionar el antígeno a la proteína Calreticulina, esto es importante si queremos simplificar el sistema mediante la inmunización con vacunas que contengan menos elementos exógenos. Estos resultados pueden tener un buen impacto en la investigación clínica.

CONCLUSIONES

1. Los adenovirus recombinantes son capaces de dirigir la expresión de las proteínas de fusión CRT/E7m y CRT/E7dm.
2. Las proteínas recombinantes CRT/E7m y CRT/E7dm son expresadas en el retículo endoplásmico.
3. Los adenovirus Ad-CRT/E7m y Ad-CRT/E7dm presentan un mejor efecto antitumoral que el Ad-CRT/E7.
4. La adición de un péptido señal y una señal de retención en retículo endoplásmico al antígeno E7 le confiere un efecto antitumoral igual al observado con la fusión de este antígeno a calreticulina.

LITERATURA CITADA

- Alba R, Bosch A, Chillon M.** Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy*. 2005; 12:18-27.
- Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G.** Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 2008; 19;26 Suppl 11:L16-36.
- Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC.** Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophysical Journal*. 1991; 60:1445-1456.
- Barbosa MS, Lowy DR, Schiller JT.** Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *Journal of Virology*. 1989; 63:1404-1407.
- Bermúdez-Morales BH, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V.** Terapia génica con citocinas contra cáncer cérvicouterino. *Salud Pública de México*. 2005; 47:458-468.
- Bharadwaj M, Hussain S, Nasare V, Das BC.** HPV & HPV vaccination: issues in developing countries. *Indian J Med Res*. 2009; 130(3):327-33.
- Burd EM.** Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003; 16(1):1-17.
- Cheng WF, Hung CF, Chen CA, Lee CN, Su YN, Chai CY, Boyd DAK, Wu TC.** Characterization of DNA vaccines encoding the domains of calreticulin for their ability to elicit tumor-specific immunity and antiangiogenesis. *Vaccine*. 2005; 23(29):3864-3874.
- Chow LT, Broker TR.** Papillomavirus DNA replication. *Intervirology*. 1994; 37(3-4):150-158.

Cid-Arregui A, Juárez V, zur Hausen H. A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. *J Virol.* 2003; 77(8):4928-37.

Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.* 1982; 1:231-236.

De Marco F, Hallez S, Brulet JM, Gesché F, Marzano P, Flamini S, Marcante ML, Venuti A. DNA vaccines against HPV-16 E7-expressing tumour cells. *Anticancer Research.* 2003; 23(2B):1449-54.

Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J Gen Virol.* 1985; 66:1515–1522.

Estadísticas de mortalidad en México: Muertes registradas en el 2001. *Salud Pública de México* 2002; 44:565-81.

Fiedler M, Müller-Holzner E, Viertler HP, Widschwendter A, Laich A, Pfister G, Spoden GA, Jansen-Dürr P, Zwerschke W. High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb-levels in cervical biopsies. *FASEB J.* 2004; 18(10):1120-2.

Firzlaff JM, Luscher B, Eisenman RN. Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proceedings of National Academic of Sciences USA.* 1991; 88:5187-5191.

-
- Frazer I.** The role of the immune system in human papillomavirus infection. *Journal of Obstetrics & Gynaecology* 1998; 18(2),72-75
- Garcia FA, Saslow D.** Prophylactic human papillomavirus vaccination: a breakthrough in primary cervical cancer prevention. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2007; 34(4):761-81, ix.
- Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M.** Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 2001; 75(3):1565–1570.
- Gómez-Gutierrez JG, Elpek KG, Montes de Oca-Luna R, Shirwan H, Sam Zhou H, McMasters KM.** Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunology Immunotherapy.* 2007; 56: 997-1007.
- He Z, Wlazlo AP, Kowalczyk DW, Cheng J, Xiang ZQ, Giles-Davis W, Ertl HC.** Viral Recombinant Vaccines to the E6 and E7 Antigens of HPV-16. *Virology.* 2000; 270:146-161.
- Hernández D., Medina EA, Ybarra R.** Histerectomía radical en cancer cérvicouterino recurrente, posterior a radioterapia primaria. *Gaceta Mexicana de Oncología, México.* 2005; 4(6):152-158.
- Howley PM, Scheffner M, Munger K.** Oncoproteins encoded by the cancer-associated papillomavirus target the products of retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes. *Quant Biol.* 1991; 56:159-155.
- Howley PM.** Papillomavirinae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*, 3rd ed. *Lippincott-Raven Publishers.* Philadelphia. 1996; 2045–2073.

-
- Hsieh CJ.** Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin. *Vaccine*. 2004; 22:3993-4001.
- Jinoch P, Zak R, Janousková O, Kunke D, Rittich S, Duskova M, Sobotkova E, Marinov I, Andelova M, Smahel M, Vonka V.** Immunization with live HPV-16 transformed mouse cells expressing the herpes simplex thymidine kinase and either GM-CSF or IL-2. *International Journal of Oncology*. 2003; 23:775-783.
- Kanda T, Furuno A, Yoshiike K.** Human Papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *J. Virol*. 1988; 152:3904-3912.
- Kawana K, Yasugi T, Taketani Y.** Human papillomavirus vaccines: current issues & future. *Indian J Med Res*. 2009; 130(3):341-7.
- Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, Snijders PJ, Walboomers JM, Hunter RD, Dyer PA, Stern PL.** Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br J Cancer*. 1995; 72:405-11.
- Kim JW, Hung CF, Juang J, He L, Kim TW, Armstrong DK, Pai SI, Chen PJ, Lin CT, Boyd DA, Wu TC.** Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Therapy*. 2004; 11(12):1011-8.
- Kim MS, Sin JI.** Both antigen optimization and lysosomal targeting are required for enhanced anti-tumour protective immunity in a human papillomavirus E7-expressing animal tumour model. *Immunology*. 2005; 116(2):255-66.
- Kim TW, Lee JH, Hung CF, Peng S, Roden R, Wang MC, Viscidi R, Tsai YC, He L, Chen PJ, Boyd DA, Wu TC.** Generation and characterization of DNA vaccines

-
- targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* 2004; 78:4638–45.
- Koutsky L.** Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997; 5;102(5A):3-8.
- Kreppel F, Kochanek S.** Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors. *Journal of Virology.* 2004; 78:9-22.
- Lin CT, Tsai YC, He L, Calizo R, Chou HH, Chang TC, Soong YK, Hung CF, Lai CH.** A DNA vaccine encoding a codon-optimized human papillomavirus type 16 E6 gene enhances CTL response and anti-tumor activity. *J Biomed Sci.* 2006; 13(4):481-8.
- Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC.** Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Can Research.* 1996; 56:21-26.
- Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R.** Structure of the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein and Its Mechanism for Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Supresor. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:578-586.
- Martínez-Flores F, Jiménez-Orozco FA, Villegas-Castrejón H.** Biología molecular de los vectores adenovirales. *Cirugía y Cirujanos.* 2006; 74:483-493.
- Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M.** Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 1999; 344:281–92.

-
- Münger K, Howley PM.** Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002; 89: 213-228.
- Münger K, Phelps WC.** The human papillomavirus-E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1155:111–123.
- Pahel G, Aulabaugh A, Short SA, Barnes JA, Painter GR, Ray P, Phelps WC.** Structural and functional characterization of the HPV-16 E7 protein expressed in bacteria. *Journal of Biological Chemistry.* 1993; 268:26018-26025.
- Park YS, Lee JH, Hung CF, Wu TC, Kim TW.** Enhancement of antibody responses to Bacillus anthracis protective antigen domain IV by use of calreticulin as a chimeric molecular adjuvant. *Infect Immun.* 2008; 76:1952–9.
- Peng S, Ji H, Trimble C, He L, Tsai YC, Yeatermeyer J, Boyd DA, Hung CF, Wu TC.** Development of a DNA Vaccine Targeting Human Papillomavirus Type 16 Oncoprotein E6. *Journal of Virology.* 2004; 78(16):8468-8476.
- Perkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55 74-108.
- Prendiville W, Davies P.** The Human Papillomavirus. In: Prendiville W, Davis P, eds. The Health Professionals HPV Handbook: Human papillomavirus and cervical cancer. *Oxford: Taylor and Francis.* 2004; 11-26.
- Richart RM.** Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol.* 1990;75: 131-36
- Rozaléna J, Ceñab V, Jordánc J.** Terapia génica. Vectores de expresión. *Genética.* *OFFARM* 2003; 22(8):102-108

-
- Russell WC.** Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology*. 2000; 81: 2573-2604.
- Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P.** Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*. 1996; 5:103–114.
- Sankaranarayanan R, Rajkumar R, Theresa R, Esmey PO, Mahe C, Bagyalakshmi KR, Thara S, Frappart L, Lucas E, Muwonge R, Shanthakumari S, Jeevan D, Subbarao TM, Parkin DM, Cherian J.** Initial results from a randomized trial of cervical visual screening in rural south India. *Int J Cancer*. 2004; 109:461-467.
- Sapp M, Volpers C, Muller M, Streeck RE.** Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol*. 1995; 76 (Pt 9): 2407-2412.
- Schiller JT, Roden RBS.** Papillomavirus-like particles. *Papillomavirus Rep*. 1995; 6:121–128.
- Scott M, Nakagawa M, Moscicki AB.** Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001; 8:209-220.
- Sellers JW. and R. Sankaranarayanan.** Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia. A Beginner's Manual, Chapter 3: An introduction to invasive cancer of the uterine cervix. *International Agency for Research on Cancer*. 2003.
- Shah KV, Howley PM.** Papillomaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, editors. *Fields Virology*, 2nd edn. Raven Press, New York. 1990; 1625–1650.

-
- Shi, Wei, Bu, Ping, Liu, Jianzhong, Polack, Axel, Fisher, Susan, Qiao, Liang.** Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA Vaccine: Mutation in the Open Reading Frame of E7 Enhances Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Induction and Antitumor Activity. *J. Virol.* 1999; 73:7877-7881
- Shillitoe EJ.** Papillomaviruses as targets for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2006; 13(5):445-50.
- Siddiqui MA, Perry CM.** Human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (Gardasil). *Drugs.* 2006; 66(9):1263-71.
- Spee P, Neefjes J.** TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur J Immunol.* 1997; 27:2441-2449.
- Stanley MA.** Replication of human papillomaviruses in cell culture. *Antiviral Res.* 1994; 24:1-15.
- Steinbrook R.** The potential of human papillomavirus vaccines. *New England Journal of Medicine.* 2006; 354(11):1109-1112.
- Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, Crawford L.** Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO Journal.* 1988; 7:1815-1820.
- Szarewski A.** HPV vaccine: Cervarix. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10(3):477-87
- Tatsis N and HC Ertl.** Adenoviruses as vaccine vectors. *Molecular Therapy.* 2004; 4:616-629.

-
- Tchernev G.** Sexually transmitted papillomavirus infections: epidemiology pathogenesis, clinic, morphology, important differential diagnostic aspects, current diagnostic and treatment options. *An Bras Dermatol.* 2009;84(4):377-89.
- Tindle RW.** Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:59-65.
- Toes RE, Offringa R, Blom RJ, Melief CJ, Kast WM.** Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:7855-7860.
- Vousden KH, Doniger J, Di Paolo JA, Lowy DR.** The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. *Oncogene Res.* 1988; 3:167-175.
- Wang KL.** Human papillomavirus and vaccination in cervical cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol,* 2007; 46(4):352-62.
- Wheeler CM.** Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities, and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2008; 35(4):519-36.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM.** Human Papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: worldwide perspective. *Journal of Virology.* 1997; 71:2463-72.
- Yewdell JW.** Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: 294–7.
- Yin R, Zheng W, Hao F, Yang XC, Zhong BY, Li QJ.** HPV16 E7 tumor antigen modified by KDEL sequence induce specific cytotoxic T lymphocytes dependent antitumor immunity. *J Dermatol Sci.* 2009; 55:116–22.

Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P.

Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *Journal of Virology*. 1995; 69:6389-6399.

Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and Post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience*. 2006; 11:2286-2302.

Zinkernagel RM. Immunology taught by viruses. *Science*. 2009; 271(5246): 173–178.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009; 384(2):260-5.

APÉNDICE

Curriculum Vitae

Artículos Publicados