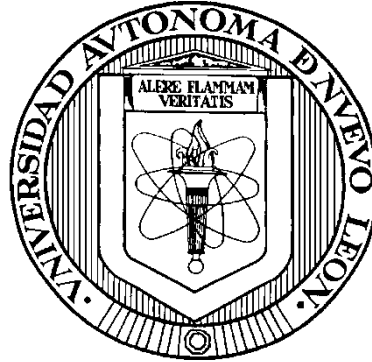


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UNA FUSOQUINA  
COMPUESTA POR IP10 Y LINFOTACTINA”**

**Por:**

**Q.B.P. Yessica Elizabeth Sánchez Lugo**

**Como requisito parcial para obtener el título de  
Maestro en Ciencias con Orientación en Morfología**

**Septiembre del 2013**

---

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UNA FUSOQUINA  
COMPUESTA POR IP10 Y LINFOTACTINA”**

**Aprobación de Tesis:**



---

**Dra. María de Jesús Loera Arias  
Director**




---

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



---

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



---

**Dr. med. Gerardo E. Muñoz Maldonado  
Subdirector de Estudios de Posgrado**

**Monterrey, Nuevo León**

**Septiembre del 2013**

---

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UNA FUSOQUINA  
COMPUESTA POR IP10 Y LINFOTACTINA”**

Presentado por

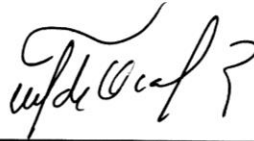
Q.B.P. Yessica Elizabeth Sánchez Lugo.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular del Departamento de Histología, Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. María de Jesús Loera Arias y la codirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna.



---

**Dra. María de Jesús Loera Arias**  
Director



---

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

# RESUMEN

Q.B.P. Yessica Elizabeth Sánchez Lugo

Fecha de Graduación: Septiembre 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: **“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE UNA FUSOQUINA COMPUESTA POR IP10 Y LINFOTACTINA”**

Número de páginas: 64

Candidato para el grado de Maestría en  
Ciencias con Orientación en Morfología

Área de Estudio: Morfología.

## Propósito y Método de Estudio:

El término “Fusoquina” se utiliza para denominar proteínas de fusión que proceden de citocinas. Las citocinas son moléculas liberadas al medio para llevar la tarea de comunicación celular. Sin embargo se conocen citocinas que juegan papeles importantes en la progresión tumoral, actividades que se conoce desarrollan las citocinas IP10 y Linfotactina. Por ello el presente trabajo tuvo como objetivo determinar si la fusoquina IP10/Lptn (FIL) muestra una mayor actividad biológica y antitumoral que sus correspondientes quimiocinas individuales. Para esto se desarrolló la construcción de un adenovirus para cada citocina en particular y la fusoquina FIL; se probó que fueran capaces de infectar nuevas células, y se determinó la producción de proteínas por Western Blot. Para conocer su actividad biológica se montó un ensayo de quimiotaxis, donde se demostró que las proteínas producidas por los adenovirus construidos eran capaces de quimioatraer linfocitos humanos activados con IL-2. Finalmente se realizó un ensayo de actividad quimioatrayente *in vivo* con ratones de la cepa C57BL/6 a los cuales se les inyectó de manera intratumoral los distintos adenovirus. Por último se llevó a cabo un ensayo antitumoral en ratones a los cuales primeramente se les inmunizó con el antígeno CRT/E7 y posteriormente se les administró los sistemas adenovirales IP10, Lptn, IP10 + Lptn, Fusoquina FIL.

## Conclusiones y Contribuciones:

Se desarrollaron diferentes adenovirus recombinantes capaces de inducir la expresión y secreción de las citocinas IP10 o Lptn, y de su respectiva fusoquina. Posteriormente se demostró que las citocinas producidas son capaces de inducir la quimioatracción de linfocitos humanos activados con IL-2; así como también se demostró la capacidad de inducir quimiotaxis *in vivo*. Finalmente se evaluó la capacidad antitumoral producida por la infección de los adenovirus recombinantes en un modelo de cáncer cervicouterino murino.



---

Director: Dra. María de Jesús Loera Arias

# AGRADECIMIENTOS

---

Primeramente quiero agradecer a mi familia por ser todos estos años mi apoyo e inspiración. A mis padres *Manuel Sánchez* y *Rosy Lugo* que con sin su cariño y guía mi desarrollo profesional sería imposible. De la misma manera agradezco a mis hermanos: *Alejandro*, *Manuel* y *Lynda*; a mi cuñado *Juan Carlos* y sobrinas *Natalia* y *Karla* por estar conmigo en todo momento.

Gracias a mi comisión de tesis: *Dra. María de Jesús*, *Dr. Roberto* y *Dra. Odila*, por su dirección y enseñanzas a mi persona, no sólo durante la duración de mi maestría sino la que he recibido cordialmente de su parte desde que llegue en el 2007 como una estudiante de verano.

Gracias a la *Dra. Aracely García*, al *Dr. Humberto Rodríguez*, al *Dr. Arturo Chávez*, al *Dr. Jorge Gómez* y al *Dr. Adrián Rosas* por todos sus consejos en la realización de este proyecto.

A quienes no considero compañeros sino mi familia del Laboratorio: *Abigail Robles*, *Alberto Barrón*, *Arnulfo Villanueva*, *Elvis Martínez*, *Gabriel Figueroa*, *Iván Martínez*, *José Juan Pérez*, *Miguel Parga* y *Rodolfo Garza*.

Gracias a todos mis compañeros de maestría por los buenos momentos; en especial a mi “compañero” *Carlos Alberto* por todo su cariño, apoyo y comprensión. Gracias a mi colega de orientación en Morfología, *Mónica Yañez* por su amistad y apoyo incondicional.

Finalmente quiero agradecer al CONACYT por el apoyo económico otorgado a una servidora, registrado con el número de beca 319543.

# CONTENIDO TEMÁTICO

---

## Capítulo 1. INTRODUCCIÓN. 1

## Capítulo 2. ANTECEDENTES. 2

2.1.	Las Fusoquinas.	2
2.2.	IP10.	4
2.3.	Linfotactina.	6
2.4.	IP10, Lptn y el cáncer.	8
2.5.	Vectores adenovirales.	10
2.6.	Definición del problema y Justificación.	12
2.7.	Hipótesis.	12
2.8.	Objetivo general.	13
2.9.	Objetivos específicos.	13

---

## Capítulo 3. MATERIAL Y MÉTODOS. 14

3.1.	Plan de trabajo.	14
3.2.	Material.	15
3.2.1.	Material biológico.	15
3.2.2.	Reactivos especiales.	16
3.2.3.	Medios de cultivo.	16
3.2.4.	Equipo.	17
3.3.	Métodos.	18
3.3.1.	Construcción y caracterización de adenovirus que expresen IP10, Lptn y la fusoquina FIL.	18
3.3.1.1.	Obtención del genoma adenoviral.	18
3.3.1.2.	Clonación de los genes de interés IP10 y Lptn en el genoma adenoviral.	20
3.3.1.3.	Producción de partículas virales.	22

---

3.3.1.4. Cuantificación de partículas virales.	24
3.3.1.5. Detección de las quimiocinas IP10 y Lptn producidas por los adenovirus recombinantes.	25
3.3.2. Análisis de la actividad biológica <i>in vitro</i> de la fusoquina FIL.	27
3.3.3. Evaluación la actividad quimioatrayente <i>in vivo</i> de la fusoquina FIL.	29
3.3.4. Análisis del efecto antitumoral de la fusoquina FIL en un modelo murino de cáncer de cérvix.	32

---

#### **Capítulo 4. RESULTADOS.**

---

4.1. Construcción y caracterización de adenovirus que expresen IP10, Lptn.	33
4.1.1. Clonación de los genes de interés en pSh.	33
4.1.2. Recombinación homóloga del plásmido pShuttle con el vector AdEasy	38
4.1.3. Caracterización del genoma adenoviral recombinante.	39
4.1.4. Producción de partículas virales.	40
4.1.5. Cuantificación de partículas virales.	42
4.1.6. Los adenovirus recombinantes son capaces de producir las proteínas de interés.	43
4.2. La proteína quimérica FIL posee actividad biológica <i>in vitro</i> .	44
4.3. La fusoquina FIL posee actividad quimioatrayente en un modelo tumoral <i>in vivo</i> .	46
4.4. Efecto antitumoral de la fusoquina FIL en un modelo murino de cáncer de cérvix.	52

---

#### **Capítulo 5. DISCUSIÓN.**

---

#### **Capítulo 6. CONCLUSIONES.**

---

#### **Capítulo 7. LITERATURA CITADA.**

---

# ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

---

- Figuras.

---

Figura 1. Estructura tridimensional de IP10.	5
Figura 2. Estructura tridimensional de la Linfotactina.	7
Figura 3. Construcción de vectores adenovirales.	11
Figura 4. Secuencia de la fusión entre IP10 y Linfotactina.	18
Figura 5. Recombinación homóloga.	21
Figura 6. Diagrama del dispositivo de quimiotaxis.	28
Figura 7. Estrategia de subclonación.	34
Figura 8. Digestión enzimática de los vectores pCIP10 y pCLptn.	35
Figura 9. Ligación de genes de interés en el vector pShuttle.	36
Figura 10. Caracterización de clonas con los genes de interés.	36
Figura 11. Tamizaje de clonas ligadas con los genes de interés.	37
Figura 12. Linearización de los vectores pShuttle.	38
Figura 13. Obtención de clonas recombinantes de pSh y pAd.	39
Figura 14. Caracterización de clonas recombinantes.	40
Figura 15. Proceso de transfección de las células HEK293.	41
Figura 16. Detección de proteínas recombinantes por Western Blot.	44
Figura 17. Ensayo de quimiotaxis.	45
Figura 18. Detección de la presencia e infección por los vectores adenovirales.	49
Figura 19. Quimioatracción de células con receptor de la quimiocina IP10.	50
Figura 20. Quimioatracción de células del sistema inmune positivas a los receptores CD16/CD22.	51
Figura 21. Evaluación del efecto antitumoral de la fusoquina IP10/Lptn.	52

- Tablas.

---

Tabla 1. Ejemplos de fusiones de citocinas (fusoquinas).	3
Tabla 2. Cuantificación de Adenovirus.	42



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>Ad</b>	Adenovirus
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CPE</b>	Efecto citopático (“Cytopathic Effect”)
<b>CTL</b>	linfocitos citotóxicos (“Cytotoxic T Lymphocyte”)
<b>g</b>	Gravedades
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente (“Green Fluorescent Protein”)
<b>IP10</b>	Proteína Inducible por Interferón 10
<b>kb</b>	kilo base
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>LB</b>	Luria-Bertoni
<b>Lptn</b>	Linfotactina
<b>mA</b>	miliampères
<b>min</b>	minuto
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>ng</b>	nanogramo

<b>NK</b>	células asesinas naturales (“Natural Killer”)
<b>OD</b>	Densidad óptica
<b>ORI</b>	Origen de replicación
<b>pC</b>	vector pCR 2.1 <sup>®</sup> Invitrogen
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PVDF</b>	Polivinilidenofluoruro
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>seg</b>	Segundos
<b>SP</b>	Péptido señal (“Signal peptide”)
<b>VI</b>	Virus infeccioso
<b>VLPS</b>	Partículas Similares a Virus (“Virus-Like Particles”)
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>%</b>	Porcentaje

# NOMENCLATURA DE PLÁSMIDOS UTILIZADOS

---

Nomenclatura	Descripción
<b>pC</b>	pCR 2.1
<b>pCIP10</b>	pCR 2.1 gen de la quimiocina IP10
<b>pCLptn</b>	pCR 2.1 gen de la quimiocina Lptn
<b>pShV</b>	pShuttle vacío (plásmido transbordador sistema AdEasy)
<b>pShIP10</b>	pShuttle clonado con el gen de la quimiocina IP10
<b>pShLptn</b>	pShuttle clonado con el gen de la quimiocina Lptn
<b>pSHFIL</b>	pShuttle clonado con el gen de la fusoquina IP10/Lptn
<b>pAdV</b>	pAdEasy vacío (plásmido que contiene los genes para la construcción del adenovirus, sistema AdEasy)
<b>pAdIP10</b>	pAdEasy con el gen de la quimiocina IP10
<b>pAdLptn</b>	pAdEasy con el gen de la quimiocina Lptn
<b>pAdFIL</b>	pAdEasy con el gen de la fusoquina IP10/Lptn

# NOMENCLATURA DE VECTORES ADENOVIRALES

---

Nomenclatura	Descripción
<b>Ad</b>	Adenovirus
<b>AdIP10</b>	Adenovirus que codifica para la quimiocina IP10
<b>AdLptn</b>	Adenovirus que codifica para la quimiocina Lptn
<b>AdFIL</b>	Adenovirus que codifica para la fusoquina IP10/Lptn
<b>AdGFP</b>	Adenovirus que codifica para la proteína verde Fluorescente
<b>AdV</b>	Adenovirus vacío

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.

---

En años recientes se ha llevado a cabo la búsqueda de nuevas terapias que induzcan la regresión de tumores establecidos. La regulación de este proceso puede estar mediada por diferentes moléculas; de entre ellas destacan las citocinas. En la actualidad existen diferentes terapias mediante el uso de citocinas que administradas de manera individual o combinada han conferido regresión tumoral, ejemplo de ellas son la Proteína inducible por Interferón 10 (IP10) y la Linfotactina (Lptn). Una nueva estrategia en desarrollo consiste en la fusión de citocinas (fusoquina), tratamiento con el cual se busca mejorar la sinergia presentada por la combinación de citocinas. En nuestro grupo de trabajo ya se ha realizado la construcción de un vector adenoviral que acarrea la fusoquina IP10/Lptn (FIL); por lo que en el presente trabajo se probará la actividad biológica y el efecto antitumoral que podría presentar esta fusoquina.

## CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.

---

### 2.1. Las Fusoquinas.

---

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular producidas por células del sistema inmune que pueden actuar mediante dos mecanismos: autocrina al modular la actividad celular, o paracrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras estirpes celulares. Además, las citocinas son importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, en la quimiotaxis celular y en la activación de células de la respuesta inmune (Bermúdez-Morales *et al.*, 2005). Las citocinas son moléculas solubles que se han agrupado en diferentes familias en base a su función, algunas de ellas son linfocinas, interleucinas y quimiocinas.

Con el fin de potenciar los efectos creados por una citocina se han desarrollado diferentes estrategias como por ejemplo, fusión de citocinas entre ellas (de la misma o diferente familia), a anticuerpos e incluso con toxinas (Du *et al.*, 2012; Jahn *et al.*, 2012; Zinser *et al.*, 2012).

Al grupo de proteínas diseñadas por medio de bioingeniería que se conforman por la fusión de dos citocinas biológicamente distintas, y que por lo tanto son de naturaleza bifuncional, se les denominan Fusoquinas (Rafei *et al.*, 2011).

Actualmente ya existen diferentes trabajos realizados mediante el uso de fusoquinas. Un ejemplo de esto es el trabajo publicado en 2005 por Acres y colaboradores donde se creó una fusoquina compuesta por IL-2 e IL-18. Esta molécula resultó ser un potente estimulador para el sistema inmune tanto innato como adaptativo (Acres *et al.*, 2005). Así mismo se ha reportado la creación de otras fusoquinas las cuales han conferido respuestas sinérgicas comparadas a la administración de las citocinas de manera individual o combinada. En la Tabla 1 se enlistan algunas de ellas (Lu *et al.*, 2008; Rafei *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2010; Rafei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013).

**Tabla 1. Ejemplos de fusiones de citocinas (fusoquinas).**

EGF / IL-18	<p>Lu, <i>et al.</i>, 2008.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>EGF-IL-18 fusion protein as a potential anti-tumor reagent by induction of immune response and apoptosis in cancer cells.</b></li> <li>• Cancer letters, 260(1-2), pp.187–97</li> </ul>
GMCSF / IL-15	<p>Rafei <i>et al.</i>, 2009.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>An engineered GM-CSF-CCL2 fusokine is a potent inhibitor of CCR2-driven inflammation as demonstrated in a murine model of inflammatory arthritis.</b></li> <li>• J Immunol. 2009 Aug 1;183(3):1759-66.</li> </ul>
GMCSF / IL 21	<p>Williams <i>et al.</i>, 2010.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>A fusion of GMCSF and IL-21 initiates hypersignaling through the IL-21R<math>\alpha</math> chain with immune activating and tumoricidal effects.</b></li> <li>• Journal of the American Society of Gene Therapy, 18(7), pp.1293–301.</li> </ul>
GMCSF / CCL2	<p>Rafei <i>et al.</i>, 2011.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>A MCP1 fusokine with CCR2-specific tumoricidal activity.</b></li> <li>• Molecular cancer, 10(1), p.121</li> </ul>
GMCSF / IL9	<p>Li <i>et al.</i>, 2013.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>A Fusion Cytokine Coupling GMCSF to IL9 Induces Heterologous Receptor Clustering and STAT1 Hyperactivation through JAK2 Promiscuity</b></li> <li>• PLOS ONE, 8 (7), p. e69405</li> </ul>

Entre la familia de las citocinas se ha enfatizado el uso de quimiocinas (citocinas quimiotácticas) en diferentes tratamientos contra el cáncer; esto dado los mecanismos de acción que algunas de estas moléculas presentan para modular el establecimiento de un tumor. Estos mecanismos son principalmente tres: regulación de neo-vascularización asociada a tumor, activación de una respuesta inmunológica y el reclutamiento de leucocitos al lugar donde se desarrolla el tumor (Frederick y Clayman, 2001).

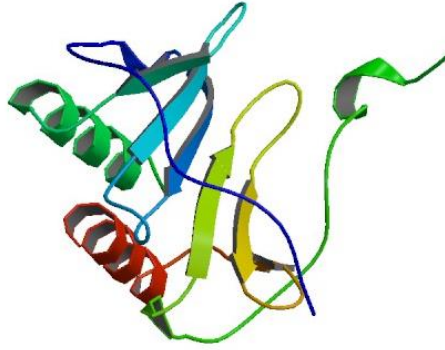
Dentro de las quimiocinas a las que se les ha asociado estos mecanismos están: Fractalina (CX3CL1), RANTES (CCL5), Proteína inducible por interferón 10 “IP10” (CXCL10) y Linfotactina “Lptn” (XCL1) (Singh *et al.*, 2007).

## 2.2. IP10.

---

La quimiocina proteína inducible por interferón gamma 10 abreviada como IP10 pertenece a la familia estructural CXC. Esta es una glicoproteína madura que tiene un peso de aproximadamente 10 kDa, peso al cual debe su nombre. Esta proteína está formada por 77 residuos de aminoácidos y consta de cinco láminas  $\beta$  y tres  $\alpha$ -hélices (Swaminathan *et al.*, 2003). La secuencia de aa de la IP10 humana tiene un 63% de homología respecto al cDNA de la IP10 murina.





**Figura 1. Estructura tridimensional de IP10.** La estructura de esta quimocina consta de cinco láminas  $\beta$  y tres  $\alpha$ -hélice.

Bajo condiciones inflamatorias la quimiocina IP10 es secretada por una variedad amplia de células como los son leucocitos, neutrófilos activados, eosinófilos, monocitos, células epiteliales, endoteliales así como estromales (fibroblastos) y queratinocitos; esto en respuesta a IFN- $\gamma$  (Cristillo *et al.*, 2003).

La quimiocina IP10 se une específicamente al receptor CXCR3 el cual es un receptor transmembranal acoplado a proteína G que cuenta con 3 isoformas: CXCR-A, CXCR-B y CXCR-alt (Furuya *et al.*, 2011).

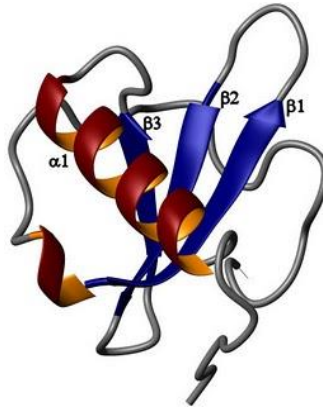
- La unión de esta quimiocina a la isoforma CXCR3-A provoca la quimioatracción de las células positivas; este receptor se encuentra expresado predominantemente en linfocitos T activados, células “natural killer” y células dendríticas inflamatorias (Liu *et al.*, 2011).

- Por otra parte la unión a la isoforma CXCR-B codifica para una proteína grande de 416 aminoácidos la cual se acopla con otras proteínas a la adenil ciclasa para llevar a cabo la inhibición de la proliferación endotelial (Feldman *et al.*, 2006). Al regular la proliferación vascular y actuar como un angiostático inhibe así el crecimiento del tumor (Sato *et al.*, 2007; Bodnar *et al.*, 2009). Además se ha descubierto que la quimiocina IP10 puede ejercer arresto de la proliferación celular sobre células HeLa, potenciando los efectos de la radioterapia (Yang *et al.*, 2012).
- La función de la unión de la quimiocina IP10 con el receptor de la isoforma CXCR-alt aún no se conoce.

### 2.3. Linfotactina.

---

La familia de quimiocinas con receptor XC solo tiene un miembro llamado XCL-1, mejor conocida como Linfotactina. Esta es una proteína catiónica de 10.2 kDa. La Lptn está formada por 93 residuos de aminoácidos y consta de tres cadenas con estructura de láminas  $\beta$  y dos  $\alpha$ -hélices, además posee un extremo largo carboxi-terminal que está asociado a la actividad quimiotáctica (Sun *et al.*, 2011). La Linfotactina humana presenta una homología del 61% con respecto a la linfotactina murina.



**Figura 2. Estructura tridimensional de la Linfotactina.** La estructura de esta quimiocina está conformada por tres cadenas con estructura de láminas  $\beta$  y dos  $\alpha$ -hélice.

La función de la Lptn permaneció indeterminada por muchos años, hasta 1994 cuando fue descrita como una proteína que inducía la quimiotaxis de una variedad de linfocitos, por lo cual obtuvo el nombre de “*linfotactina*” (Kroczek y Henn, 2012).

La quimiocina Lptn es expresada por diferentes células del sistema inmune incluyendo a células T CD8<sup>+</sup> activadas, células T CD4<sup>+</sup>, células NK y NKT, así como células tímicas epiteliales. Esta quimiocina transmite señales de quimioatracción al unirse al receptor XCR1, el cual está presente en células T CD3<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup> anergizadas, neutrófilos y células dendríticas (Lei y Takahama, 2012).

Anteriormente solo se conocía que esta proteína tiene un papel en el mantenimiento de la integridad del epitelio y en respuestas inmunes mucosas. Recientemente se ha probado que la actividad antitumoral de Lptn puede resultar en la regresión de tumores debido a la atracción de células NK y linfocitos (Huang *et al.*, 2002). Esta conclusión también se vio reflejada por este grupo de investigación en otro modelo terapéutico de transferencia de linfocitos, en donde el efecto se potenció por la actividad quimiotáctica de la Lptn (Huang *et al.*, 2005).

Además se ha probado que la Lptn en conjunto con otras terapias puede potenciar la citotoxicidad de los CTL y de las células NK; esto dado que incrementa la producción de la citocina IL-2 e Interferón gama (Xia *et al.*, 2002).

#### 2.4. IP10, Lptn y el cáncer.

---

El papel que desempeñan las citocinas en la progresión del cáncer es diverso. Por un lado se conoce que su ausencia podría afectar la migración de células efectoras a sitios de tumor. Tal como ocurre con la quimiocina IP10 cuya expresión se ha correlacionado inversamente con la progresión del cáncer de pulmón (Kakinuma & Hwang, 2006). Además se sabe que las citocinas pueden

inducir la expresión de nuevas citocinas al unirse a sus células diana, favoreciendo efectos sinérgicos entre ellas.

Se ha demostrado en ratones que la quimiocina IP10 puede tener un efecto sinérgico con otras citocinas. Un ejemplo de ello fue la coadministración de dos adenovirus, uno codificante para IL-12 y otro para IP10, donde se logró el 100% de regresión en tumores colo-rectales previamente establecidos (Narvaiza *et al.*, 2000).

De igual manera se ha probado el efecto antitumoral sinérgico que puede presentar la Linfotactina con otras citocinas, esto mediante un modelo de células de neuroblastoma modificadas que co-expresaban IL-2 y Lptn; este tratamiento se probó en ensayos clínicos de fase I, el cual indujo una respuesta inmune antitumoral; sin embargo, fue discontinuado por presentar toxicidad asociada a la administración de IL-2 (Russell *et al.*, 2007).

En el año 2004 se probó el efecto antitumoral de la combinación de las quimiocinas IP10 y Linfotactina, esto a través de su inserción y producción en vectores adenovirales independientes para cada una de ellas. La combinación de ambas quimiocinas resultó en un efecto antitumoral de 2 a 4 veces mayor

que el encontrado por cada quimiocina por separado, además de que se observó una regresión tumoral en el 87% de los ratones (Huang y Xiang, 2004).

Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la creación de la fusoquina conformada por IP10 y Lptn, esto es importante para conocer el efecto sinérgico de ambas citocinas en la regresión de tumores.

## 2.5. Vectores adenovirales.

---

El uso de vectores adenovirales ofrece como vacuna muchas ventajas entre ellas la eficacia, seguridad y estabilidad. Además, los adenovirus infectan a un amplio rango de células, tanto a las que tienen división activa, así como a células que han pasado por un proceso mitótico (Rocha *et al.*, 2004; Mizuguchi y Takao, 2004; Sharma *et al.*, 2009).

La construcción de vectores adenovirales se lleva a cabo con la remoción de la región E1 del genoma viral lo cual resulta en virus no replicativos. La multiplicación de estos virus es posible solo en células permisivas como las HEK293 (“*Human embryonic kidney 293*”). Estas pueden completar las funciones perdidas por la depleción de la región E1, lo que permite la multiplicación y purificación segura de estos virus recombinantes *in vitro* (Rocha *et al.*, 2004).

En general es posible resumir como cualidades de los vectores adenovirales su facilidad de construcción, que se pueden producir altos títulos y poseen una alta eficiencia de transducción (Mizuguchi y Takao, 2004).



**Figura 3. Construcción de vectores adenovirales.** Fotomicrografía donde se muestra un cultivo de células antes de ser infectado con el AdGFP (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). Obtenida de Loera-Arias, 2010.

## 2.6. Definición del problema y Justificación.

---

- Debido a que el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial es importante la búsqueda y/o mejora en las terapias que ayuden contra este padecimiento.
- En los últimos años se han desarrollado estrategias que se basan en el uso de quimiocinas con actividad antitumoral. Dos de estas quimiocinas son la IP10 y la Lptn a las cuales se les ha demostrado que al usarse de manera combinada presentan un efecto sinérgico en un modelo antitumoral. Por tal motivo es importante evaluar el efecto que podrían tener en el contexto de una fusoquina.

## 2.7. Hipótesis.

---

- La fusoquina IP10/Lptn (FIL) presenta una mayor actividad biológica y antitumoral que el de las quimiocinas administradas individualmente en un modelo murino de cáncer de cérvix.



## 2.8. Objetivo general.

---

- Determinar si la fusoquina FIL muestra una mayor actividad biológica y antitumoral que sus correspondientes quimiocinas individuales.

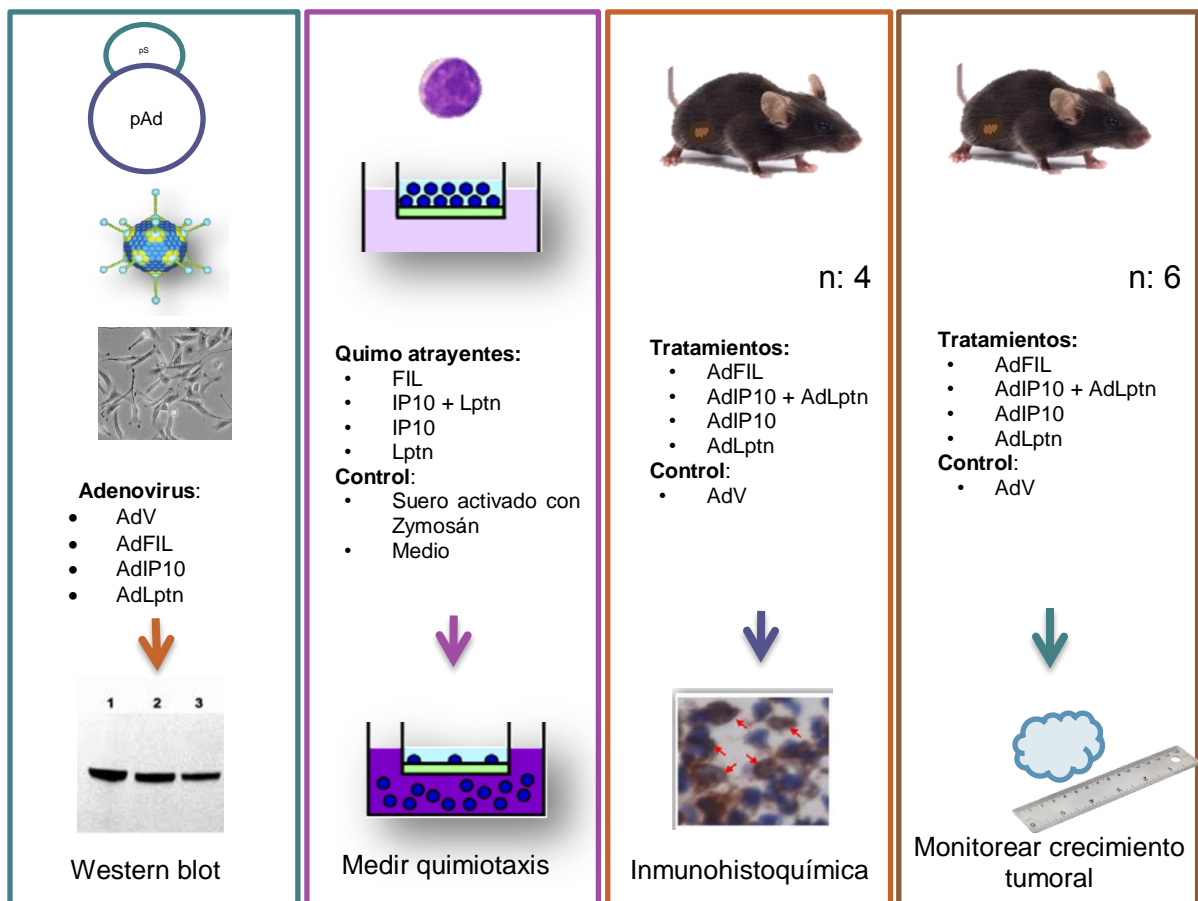
## 2.9. Objetivos específicos.

---

1. Construir y caracterizar adenovirus que expresen IP10, Lptn y la fusoquina FIL.
2. Demostrar que la fusoquina FIL posee actividad biológica.
3. Evaluar la actividad quimioatrayente de la fusoquina FIL en un modelo tumoral *in vivo*.
4. Analizar el efecto antitumoral de la fusoquina FIL en un modelo murino de cáncer de cérvix.

# CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

## 3.1. Plan de trabajo.



## 3.2. Material.

---

### 3.2.1. Material biológico.

---

- Cepas de *E. coli*:
  - BJ5183 (Genotipo: endA, sbcB-, recBC-, str<sup>R</sup>).
  - DH5 $\alpha$  (Genotipo: endA, hsdR17, recA1).
- Líneas celulares:
  - HEK293 (Línea obtenida a partir células embrionarias humanas de riñón generadas por la transfección con el Adenovirus 5).
  - HeLa (Línea obtenida a partir de células humanas de carcinoma epitelial cervical).
  - TC-1 (Línea celular derivada de células epiteliales de pulmón de la cepa de ratón C57BL/6 transformada con los oncogenes ras, E6 y E7 del HPV16).
- Anticuerpos:
  - Anti-Lptn Humana (policlonal; R& D Systems, E.U.A.).
  - Anti-IP10 Humana (policlonal; R& D Systems, E.U.A.).
  - Anticuerpo secundario anti-goat conjugado a peroxidasa (Pierce, E.U.A.).
  - Anti-CXCR3 (policlonal; USBiological, E.U.A.).
  - Anti-CD16/CD32 (monoclonal; BD Biosciences Pharmingen, E.U.A.).

- Anti-Adenovirus hexón (monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.).
- Enzimas: *Bam*HI (New England Biolabs, E.U.A.), *Pme*I (New England Biolabs, E.U.A.), *Pac*I (New England Biolabs, E.U.A.), T4 Ligasa (Promega, E.U.A.), *Taq* (GoTaq, Promega, E.U.A.).

### 3.2.2. Reactivos especiales.

---

- Marcador de peso molecular, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, E.U.A.).
- Kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, E.U.A.).
- Kit Plasmid Midi Kit (Qiagen, E.U.A.).
- Kit SuperSignal West Pico para peroxidasa (Pierce Co., E.U.A.).
- ViraBind™ Adenovirus Purification Kit (Cell Biolabs Inc., E.U.A.).
- TurboFect™ (Fermentas, E.U.A.).
- Ficoll Paque Plus (GE, E.U.A.).
- Interleucina 2 humana (Santa Cruz Biotech., E.U.A.).
- Zymosan (Sigma, E.U.A.).
- WST-1 (Roche Applied Science, Alemania).

### 3.2.3. Medios de cultivo.

---

- Medio Luria-Bertoni (LB) caldo y agar (Gibco, E.U.A.).

- Medio Eagle Modificado de Dubelcco (DMEM) con y sin rojo Fenol (Gibco, E.U.A.).
- Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Gibco, E.U.A.).

#### 3.2.4. Equipo.

---

- Micropipetas de volúmenes de 0.5 $\mu$ L a 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L a 200 $\mu$ L, 200 $\mu$ L a 1000 $\mu$ L.
- Cámaras de electroforesis.
- Incubadora de CO<sub>2</sub>.
- Campana de seguridad Nivel II.
- Microscopio invertido.
- Microcentrífuga.
- Refrigerador (4°C).
- Congelador (-20°C).
- Ultra refrigerador (-80°C).
- Tanque de Nitrógeno.

### 3.3. Métodos.

---

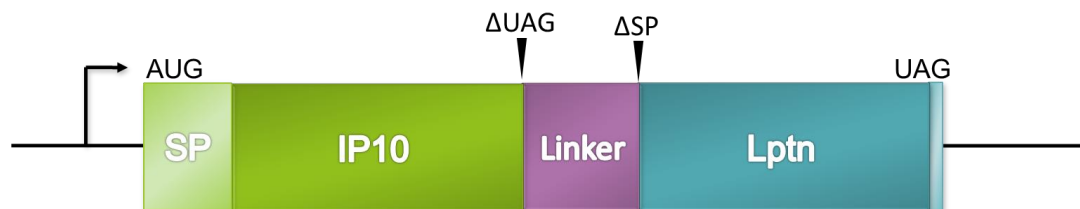
#### 3.3.1. Construcción y caracterización de adenovirus que expresen IP10, Lptn y la fusoquina FIL.

---

##### 3.3.1.1. Obtención del genoma adenoviral.

---

La Fusoquina IP10/Lptn (FIL) fue diseñada, construida y caracterizada previamente (Sánchez-Lugo, 2011). Su diseño se basa en un marco de lectura para ambas citocinas, eliminando la secuencia de terminación de una primera citocina (IP10) y el péptido señal de la segunda citocina (Lptn); entre ambas se colocó una secuencia “*linker*” la cual codifica para el péptido (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> que ya ha sido descrito por varios autores (Lode *et al.* 1998; Ziegler *et al.* 2012) para la construcción de proteínas de fusión. La secuencia de la fusoquina fue procesada en el sistema AdEasy™ Adenoviral Vector System (Agilent Technologies, E.U.A.) para la construcción de partículas virales.



**Figura 4. Secuencia de la fusión entre IP10 y Linfotactina.** Se muestran en color verde la secuencia perteneciente al gen codificante para IP10; en color azul la secuencia perteneciente a linfotactina; en color morado la secuencia linker. AUG, codón de inicio de la traducción; UAG, codón de terminación de la traducción; SP, péptido señal; **Δ**, deleción.

En este trabajo se comenzó con la construcción de los Adenovirus IP10 (AdIP10) y el Adenovirus Lptn (AdLptn), ya que nos servirán como controles para comparar el efecto de la fusoquina contra cada quimiocina de manera individual o combinada. Para realizar esto primero se obtuvieron las secuencias codificantes para cada quimiocina a partir de las bases de datos del GenBank (NCBI, E.U.A.). Estas secuencias se mandaron sintetizar a la compañía Eurofins MWG Operon (E.U.A.), de donde se enviaron las secuencias clonadas en el vector pCR<sup>®</sup>2.1 (Invitrogen, E.U.A.). Todas las secuencias utilizadas en este trabajo fueron optimizadas al momento de la síntesis de los genes para su expresión por células humanas mediante el uso de codones preferenciales.

La obtención de partículas adenovirales se llevó a cabo mediante el uso del sistema AdEasy Adenoviral Vector System (Agilent Technologies, E.U.A.) para lo cual primeramente es necesario clonar las secuencias a expresar en el vector transbordador pShuttle (pSh), por lo que fue necesario subclonar a partir del vector pCR<sup>®</sup>2.1 (pC) al vector antes mencionado. Esto se logró por medio de la digestión de los plásmidos con las enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII*. El resultado de la digestión fue analizado en un gel de agarosa al 0.8% a partir del cual se purificó el fragmento del gen de interés de cada plásmido por el Kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific, E.U.A.). En reacciones por separado se llevó a cabo la ligación de los genes de interés con el vector pSh mediante el uso de la enzima T4 Ligasa (Promega, E.U.A.). Una vez obtenida la ligación se procedió a transformar bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ , de donde

se levantaron las colonias resistentes a kanamicina y se realizó un tamizaje mediante PCR a fin de corroborar su transformación.

El PCR consistió en amplificar la región de nuestro gen de interés, la cual tiene un tamaño de 616 pb para Lptn y de 571 pb para IP10, para esto se utilizaron los oligos: pSh fw (5' TTTAGTGAACCGTCAGATCCGC 3') y pSh rw (5' ACCTCTACAAATGTGGTATGGC 3') los cuales flanquean el sitio múltiple de clonación del vector. La reacción se realizó de acuerdo a las especificaciones técnicas de la enzima Taq (GoTaq, Promega E.U.A.) con el siguiente ciclo de amplificación: 94°C por 4 min, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 57°C por 1 min y 72°C por 1.5 min. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 0.8%

#### 3.3.1.2. Clonación de los genes de interés IP10 y Lptn en el genoma adenoviral.

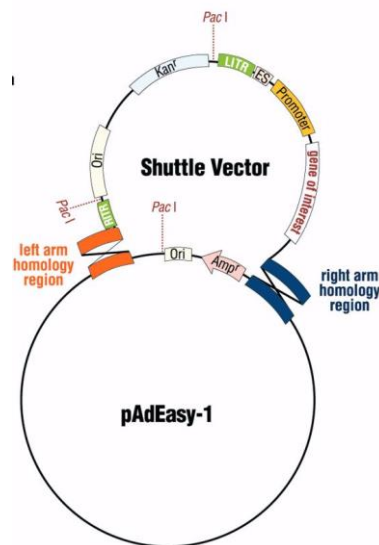
---

Para la obtención del genoma adenoviral portando las secuencias de las quimiocinas individuales, éstas primero se clonaron en el plásmido pSh (pShIP10 y pShLptn) y se recombinaron con el plásmido pAd. Para esto se utilizó la cepa de *E. coli* BJ5183 que permite la recombinación entre ambos plásmidos. La recombinación se efectuó co-transformando con el pAd y con los



vectores pShIP10 y pShLptn linearizados con la enzima *Pme I* (New England Biolabs, Inc. E.U.A.) en reacciones independientes. Las condiciones utilizadas por el electroporador para la co-transformación son: 2500 V, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F.

Para cada recombinación se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina; se obtuvo su DNA plasmídico y se llevó a cabo una digestión con la enzima *PacI* (New England Biolabs, EU). Mediante esta digestión es posible caracterizar las clonas recombinantes. El patrón de corte será de un fragmento de aproximadamente 30 Kb y otro fragmento el cual puede variar según el tipo de recombinación de aproximadamente 3.5 Kb o 4.0 Kb; esto debido a que la recombinación puede ocurrir en la secuencia homóloga del brazo izquierdo o el origen de replicación de *E. coli*.



**Figura 5. Recombinación homóloga.** Posibles regiones de recombinación homóloga entre el plásmido transportador pShuttle (pSh) y el plásmido pAdEasy (pAd).

### 3.3.1.3. Producción de partículas virales.

---

Una vez obtenido el genoma adenoviral se transfectó en la línea celular HEK293, la cual expresa de manera constitutiva el gen E1 que se encuentra deletado en el genoma viral y es necesario para la producción de partículas virales. La transfección se llevó a cabo mediante el reactivo *TurboFect*<sup>™</sup> (Fermentas, E.U.A.) el cual es una solución estéril de polímeros catiónicos en agua. Estos polímeros forman complejos compactos, estables de carga positiva con el DNA, los cuales lo protegen de la degradación y facilitan su transporte hacia el interior de células eucariotas.

Para la transfección se utilizaron 200,000 células HEK sembradas en placas de 60 mm a las cuales se les adicionó 6µl del reactivo *TurboFect*<sup>™</sup>, incubado previamente a temperatura ambiente por 20 minutos con 4 µg de DNA adenoviral digerido con la enzima *Pac I*. Después de la transfección las células se incubaron a 37°C en un ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%. Se realizaron observaciones diarias a las células en busca del efecto citopático (células redondeadas con núcleos prominentes), lo cual indica la producción de partículas virales. Como control de la transfección se utilizó el Ad-GFP, ya construido por nuestro equipo de trabajo, el cual produce la Proteína Verde Fluorescente visible en un microscopio de fluorescencia (Leica, E.U.A.).

Una vez que se observaron células con efecto citopático (entre 10 y 12 días), las células fueron cosechadas y se realizaron extractos con el fin de obtener partículas virales para la infección de nuevos cultivos de células HEK293. Para la realización de los extractos fue necesaria la disgregación mecánica de las células junto con el medio de cultivo en tubos tipo Falcon de 50ml. Con el fin de lisis las células para liberar la mayor cantidad de viriones los tubos se llevaron a tres ciclos de congelación y descongelación y se centrifugaron a 1000 g por 5 minutos. Finalmente se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, este sobrenadante que contiene los viriones infectivos se conservó a -20°C.

Para generar y purificar una cantidad mayor de partículas virales fue necesario sembrar 4 cajas T75 con  $3 \times 10^6$  de células HEK293; al llegar a una confluencia de 70% se realizó la infección con los extractos adenovirales IP10, Lptn y AdV. El efecto citopático se observó a los 3 días. Se procedió a hacer los extractos para la liberación de viriones según el procedimiento anterior. El sobrenadante conteniendo las partículas virales fue purificado por medio del Kit ViraBind™ Adenovirus Purification Kit (Cell Biolabs Inc., E.U.A.) según instrucciones del fabricante.

#### 3.3.1.4. Cuantificación de partículas virales.

---

La cuantificación de partículas virales se realizó con dos métodos: uno físico y otro químico.

El método físico se basa en la evaluación de partículas virales correlacionando su contenido de DNA. El coeficiente de extinción es de  $1.1 \times 10^{12}$  virus por unidad de OD 260. Para llevar a cabo este procedimiento primeramente se someten las partículas virales purificadas a lisis por el buffer VLB (0.1% SDS, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7.4), en diluciones 1:2, 1:5, 1:10 y 1:20. Las diluciones se incuban por 10 minutos a 56°C con agitación vigorosa. Cada dilución fue leída por duplicado por espectrometría a una OD260. El resultado final será el promedio de todas las diluciones.

El método biológico se basa en el desarrollo de CPE en las células HEK293 usando diluciones de punto final para determinar las partículas virales efectivas. Para llevar a cabo este experimento se utilizaron 1000 células HEK293 (100µl de medio DMEM, 2% FBS, 1X glutamina, 1X antibióticos) por pozo en una placa de 96 pozos planos; se incubaron por 24 horas para su adhesión. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó 200 µl del adenovirus purificado en diluciones de  $1 \times 10^{-3}$  hasta  $1 \times 10^{-10}$  con 10 repeticiones cada dilución. Se utilizaron 2 pozos control por dilución, en los que solo se adicionó 200 µl de medio. La placa se incubó por 10 días en una incubadora húmeda con las

siguientes condiciones: 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Transcurridos los 10 días se analizó la placa y se contabilizó la existencia de CPE por cada pozo de cada dilución (radio de células con CPE por dilución). Un pozo se consideró positivo si incluso solo existieran algunas células que mostraran CPE. El ensayo se consideró válido cuando las células de la dilución menor ( $1 \times 10^{-10}$ ) no mostraban CPE. El título viral se determinó utilizando el método estadístico Karber, donde para una dilución de 100 µl el título será de  $T = 10^{1 + d(S - 0.5)}$ , en el cual d será igual al Log 10 de la dilución (1; ya que es una dilución 1 a 10) y S, la suma de los radios. Se ha validado que los títulos adenovirales medidos por TCID<sub>50</sub> es 0.7 Log mayor que en PFU/ml, por esta aseveración es posible transformar las unidades de TCID<sub>50</sub> a PFU/ml; al restar 0.7 Log al exponente encontrado en la titulación por TCID<sub>50</sub> (AdEasy vector system, Qbiogene, Inc.).

#### 3.3.1.5. Detección de las quimiocinas IP10 y Lptn producidas por los adenovirus recombinantes.

---

Para la detección de la proteína recombinante se sembraron células HeLa y se infectaron por separado con los adenovirus recién construidos AdIP10 y AdLptn, además de con AdV y células sin infectar como control negativo. Además el experimento se realizó usando como control positivo células infectadas por el AdFIL ya caracterizado.

A las 48 horas de infección con los adenovirus antes descritos se obtuvo la fase sobrenadante, la cual se centrifugó para descartar a las células; y estos sobrenadantes fueron tratados con buffer DTT-LB 4x (Tris-HCl, pH 6.8 50 mM, SDS 2%, glicerol 10%, EDTA 12.5 mM, azul de bromofenol 0.02% y DTT 1%). Estos sobrenadantes se cargaron de manera idéntica por duplicado en diferentes geles de Acrilamida-SDS al 15% y se corrieron a 80 volts en buffer Tris-Glicina-SDS. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (Milipore Corp., E.U.A.) en una cámara de transferencia semi-húmeda por 20 minutos a 120 mili Amperes. Acto seguido, se bloquearon las membranas en buffer TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137mM, pH 7.6, Tween 20 0.05%) con leche descremada sin grasa al 10%. Las membranas se incubaron por 1 hora a una temperatura de 4°C; después de este tiempo se realizaron 3 lavados con buffer TBST de 15 minutos cada uno, al finalizar los lavados se incubaron las membranas cada una con un anticuerpo primario distinto: anti-IP10 y anti-Lptn, las condiciones de incubación fueron de 4°C con agitación suave, posterior a esto se realizaron 3 lavados con buffer TBST de 15 minutos cada uno y se incubaron ambas membranas con el anticuerpo secundario (anti-cabra conjugado a peroxidasa) a una dilución de 1:20,000 por una hora. Después se dieron lavados de 15 minutos a las membranas con buffer TBST y se revelaron por quimioluminiscencia con el Kit *Super Signal West Dura* para peroxidasa (Pierce Co., E.U.A.).

### 3.3.2. Análisis de la actividad biológica *in vitro* de la fusoquina FIL.

---

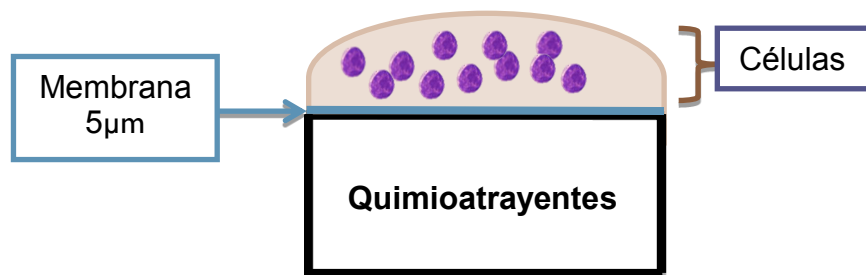
Las células utilizadas para medir actividad biológica fueron linfocitos humanos obtenidos a partir de sangre periférica de un voluntario. A una parte de sangre periférica (heparinizada) se le agregó una parte igual de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHPO 10 mM, KH<sub>2</sub>PO 2mM). Mientras en un tubo nuevo se colocó otra parte igual de *Ficoll Paque PLUS* (GE Healthcare, E.U.A.) y se agregó la sangre diluida en PBS por las paredes del tubo, esto se centrifugó a 400g a 19°C por 40 minutos, al cabo de este tiempo se observó el gradiente de densidad creado por el reactivo *Ficoll-Paque* de donde se recuperó la fase que corresponde a las células mononucleares con una pipeta serológica y se conservaron en un tubo nuevo. A estas células se les dieron tres lavados con PBS, centrifugando a 100g a 19°C por 10 minutos en cada lavado. Después del tercer lavado las células se colocaron en cultivo con medio RPMI 1640 (Gibco, E.U.A.) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Sigma, E.U.A.), antibióticos 1x, piruvato de sodio 1x y 10U de interleucina humana IL-2 (R&D systems., E.U.A.) a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 21 días.

Como quimioatrayente se utilizó el sobrenadante (300µl) de la infección de 300,000 cél HEK293 con  $1 \times 10^6$  PV con los adenovirus AdIP10, AdLptn, AdFIL y AdV como control negativo (todas las muestras se procesaron por triplicado). Para el tratamiento conformado por la combinación de los sobrenadantes

infectados por las citocinas individuales (AdIP10 + AdLptn) se utilizó 150  $\mu$ l de cada uno.

Como control positivo se utilizó suero fetal bovino con complemento activado. A este suero se le agregó Zymosan (Sigma, E.U.A.) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Como control negativo se utilizaron los extractos celulares de células no infectadas (todas las muestras se procesaron por triplicado).

Para llevar a cabo este objetivo se procedió a montar un ensayo de quimiotaxis el cual consta de un dispositivo de dos cámaras separadas por una membrana; en la cámara inferior se coloca la solución quimioatrayente mientras que en la cámara superior se colocan las células que serán quimioatraídas.



**Figura 6. Diagrama del dispositivo de quimiotaxis.** El dispositivo de quimiotaxis consta de dos cámaras separadas por una membrana. En la cámara inferior se coloca el quimioatrayente deseado, separado por una membrana en este caso de 5 $\mu$ m; mientras que en la parte superior se colocan las células que serán quimioatraídas.

Para la realización del experimento se utilizó el dispositivo ChemTax (Neuroprobe, E.U.A.) con una membrana de poro de 5 $\mu$ m.



El dispositivo montado se incubó por 2 horas, se obtuvo 100µl de la cámara inferior en una placa de 96 pozos y se añadió 10 µl del reactivo WST-1; el cual es un reactivo que mide actividad enzimática producida por las células vivas. Las células y el reactivo se incubaron por un lapso de 20 horas. Pasado el tiempo de incubación se leyó el resultado en un lector de placas 96 pozos (iMark, BioRad E.U.A.) a 450 nm con un filtro de referencia de 650nm. Los resultados obtenidos se expresan en % de células atraídas en base a un control del número total de células cargadas por pozo. Los resultados fueron analizados utilizando la prueba estadística ANOVA para comparaciones múltiples.

### 3.3.3. Evaluación la actividad quimioatrayente *in vivo* de la fusoquina FIL.

---

Para este experimento se utilizaron ratones de 6-8 semanas de edad a los cuales se les inyectaron de manera subcutánea en el costado derecho  $4 \times 10^4$  células TC-1 por ratón (día 0).

A los 15 días, cuando el tumor se encontraba palpable, se inmunizaron con el plásmido CRT/E7 el cual es un plásmido construido y caracterizado por Kim *et al.*, 2004; el objetivo de transfectar este plásmido es el activar a las células del ratón para la respuesta en contra del tumor. La transfección se realizó por medio de Biobalística, acoplando 1µg de DNA (pShuttle CRT/E7) con las

partículas de Oro de 1  $\mu\text{m}$ . Este complejo fue disparado por medio del sistema Helios<sup>®</sup> Gen Gun (Bio-Rad, E.U.A.) a una presión de 300 psi en el abdomen de cada ratón.

Al día 22 del experimento se administró a los ratones por medio de una inyección intratumoral  $1 \times 10^6$  P.V. en un volumen final de 120  $\mu\text{l}$  PBS estéril, con los Adenovirus: AdIP10, AdLptn, AdIP10 + AdLptn ( $1 \times 10^3$  P.V. por cada adenovirus), AdFIL o AdV. Para este experimento además se incluyó un grupo negativo a la activación por CRT/E7 y negativo a la administración de adenovirus.

A las 24 y 48 horas posteriores se sacrificaron 2 ratones de cada grupo respectivamente. Se realizó la disección del tumor, el cual fue fijado en PFA al 4% para su posterior inclusión y corte en microtomo.

Los cortes se montaron en laminillas cargadas (Superfrost Plus, Fisher Scientific, E.U.A.) y se hidrataron (xileno, serie de alcoholes de 100° a 70°, agua destilada). La recuperación de antígenos se llevó en buffer de citrato (10 mM ácido cítrico, 10 mM citrato de sodio, 0.05% Tween 20, pH 6.0) en una vaporera sellada. El bloqueo de Peroxidasa endógena se realizó mediante la incubación de las secciones con 0.3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua durante 20 min a temperatura ambiente. Además se bloqueó la unión no específica del anticuerpo incubando las secciones en Buffer TBS con 3% de suero de caballo y 0.05% de Tritón X-100 durante 1 hora a 4°C.

La inmunodetección se llevó a cabo utilizando anticuerpos contra: CXCR3 a una dilución 1:500 (receptor de la citocina IP10); CD16-CD22 a una dilución 1:500 (células B, NK, cebadas, dendríticas; monocitos/macrófagos, granulocitos) y como control de la infección con el adenovirus se usó un anticuerpo anti-hexón dirigido contra la cápside adenoviral a una dilución 1:50. Todas las muestras con los anticuerpos primarios se incubaron por una noche. Se dieron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X.

Se utilizó el kit de detección Vectastain® ABC Systems (Vector Laboratories, E.U.A) dicho kit cuenta con el anticuerpo secundario anti-conejo/ratón biotinilado conjugado con HRP, con el cual se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se dieron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X.

Finalmente las laminillas procesadas fueron reveladas mediante la adición del sustrato diaminobencidina con el kit DAB Peroxidase Substrate Kit, 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories, E.U.A). Posterior al proceso de inmunodetección las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina convencional (10 seg en Hematoxilina, 10 seg en alcohol ácido, 3 lavados con agua corriente) y montadas en el medio acuoso Vikel (donado por el M.C. Víktor Romero).

### 3.3.4. Análisis del efecto antitumoral de la fusoquina FIL en un modelo murino de cáncer de cérvix.

---

Para analizar el efecto antitumoral terapéutico se utilizaron ratones hembras de 6-8 semanas de edad, 5 por cada tratamiento. Estos se inyectaron con  $4 \times 10^4$  células TC-1 por ratón mediante una inyección subcutánea en el costado derecho (día 0).

A los 11 días, cuando el tumor se encontraba palpable, se realizó la inmunización con el plásmido CRT/E7 (Kim *et al.* 2004) por medio de Bio-balística, disparando  $1 \mu\text{g}$  de DNA (pShCRT/E7) con partículas de Oro de  $1.0 \mu\text{m}$ . Este complejo fue disparado por medio del sistema Helios<sup>®</sup> Gen Gun (Bio-Rad, E.U.A.) a una presión de 300 psi en el abdomen de cada ratón.

Al día 18 del experimento se administró los vectores adenovirales a los ratones por medio de una inyección intratumoral la cual contenía  $1 \times 10^6$  P.V. en un volumen final de  $120 \mu\text{l}$  de PBS estéril, con los siguientes tratamientos: AdIP10, AdLptn, AdIP10 + AdLptn ( $1 \times 10^3$  P.V. por cada adenovirus), AdFIL o AdV. De igual manera se incluyó un grupo negativo a la activación por CRT/E7 y negativo a la administración de adenovirus.

El crecimiento tumoral se monitoreo cada tercer día y se graficó el volumen tumoral con base a la fórmula: volumen tumoral=  $((\text{diámetro menor})^2 (\text{diámetro mayor}))/2$ .

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS.

---

### 4.1. Construcción y caracterización de adenovirus que expresen IP10, Lptn.

---

---

#### **Clonación de los genes IP10 y Lptn en el genoma adenoviral.**

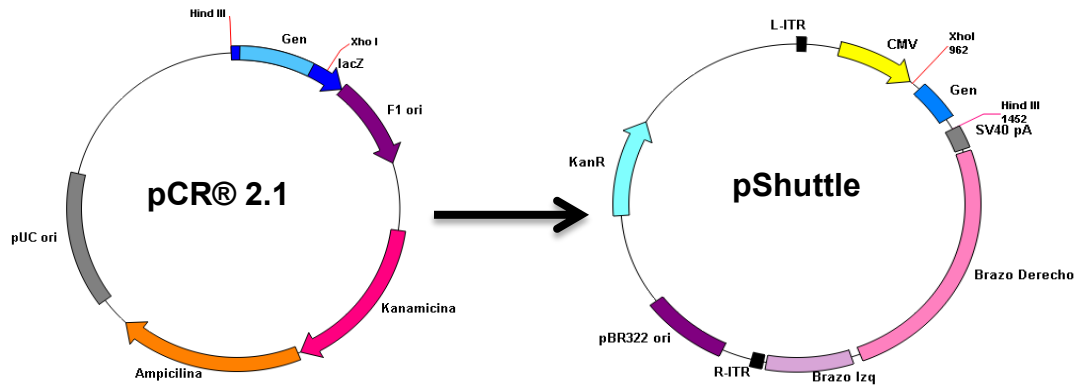
Para la construcción y caracterización de los adenovirus se requirió de distintos pasos: (1) clonar el gen de interés dentro del plásmido pSh, (2) recombinar los plásmidos pSh y pAd, (3) caracterizar el genoma adenoviral recombinante, (4) transfectar el DNA recombinante para la producción de partículas virales y (5) probar que el adenovirus es capaz de dirigir la expresión de la proteína recombinante.

#### 4.1.1. Clonación de los genes de interés en pSh.

---

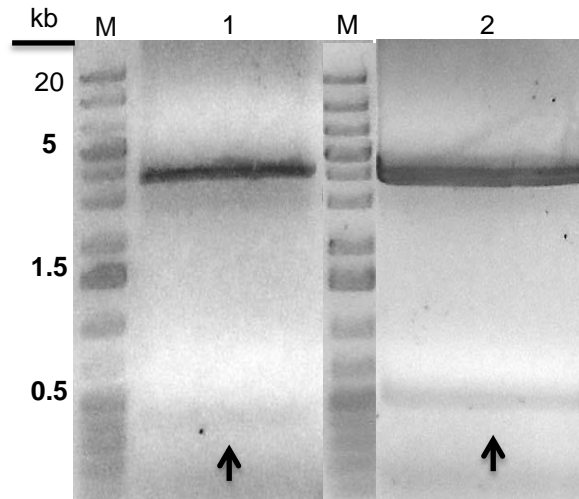
---

Los genes para las quimiocinas IP10 y Lptn fueron enviados a sintetizar de manera individual optimizados por la compañía *Eurofins mwg operon* (E.U.A.). Estos genes llegaron clonados cada uno en un plásmido pCR<sup>®</sup>2.1 (pC), de donde fue necesario subclonar para su proceso en el sistema AdEasy.



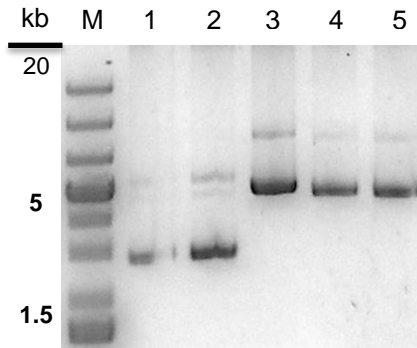
**Figura 7. Estrategia de subclonación del vector pCR2.1 al vector pShuttle.** A partir del vector pCR 2.1 se obtuvieron los genes de interés los cuales se clonaron de manera dirigida por las enzimas *HindIII* y *XhoI*, en el vector pShuttle.

La estrategia de subclonación de los genes de interés consistió en liberar el fragmento del gen de interés del esqueleto del plásmido por medio de una digestión enzimática con las enzimas *HindIII* y *XhoI*. Con esta digestión se obtuvo para el vector pCIP10 la liberación de dos fragmentos: el esqueleto del plásmido de 3.8 Kb y de el gen de interés de un tamaño de 0.445 Kb; de igual manera en la digestión del vector pCLptn se obtuvieron fragmentos de 3.8Kb para el esqueleto del plásmido y de 0.490 pb para el gen de interés; los fragmentos correspondientes con los genes de interés fueron purificados a partir del gel de agarosa (Figura 8).



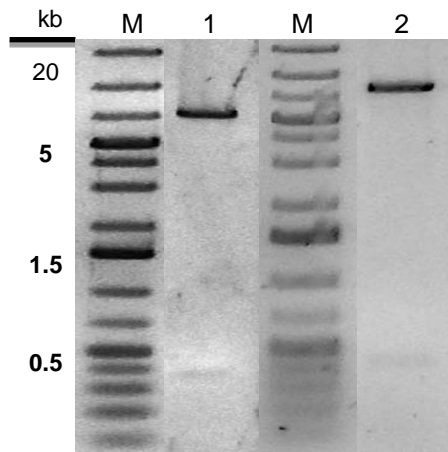
**Figura 8. Digestión enzimática con *HindIII* y *XhoI* en los vectores pCIP10 y pCLptn.** Carril 1, pCIP10 digerido; carril 2, pCLptn digerido. Las flechas indican la liberación del gen de interés, de 0.445 para pCIP10 y de 0.490 para pCLptn. M, Marcador de peso molecular 1 kb. Gel de agarosa al 0.8%.

Una vez purificados los fragmentos fueron ligados con el vector pSh previamente digerido con las enzimas *HindIII* y *XhoI* y transformados en bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  calcio competentes, las cuales fueron plaqueadas en LB agar con kanamicina, de donde se levantaron colonias resistentes a las cuales se les llevó a cabo la extracción del DNA plasmídico. El DNA se corrió en un gel para su análisis donde se pudo apreciar, tanto para pShIP10 como pShLptn, un tamaño aproximado a las 7.5 kb lo cual corresponde al tamaño del vector pSh, mientras que en los vectores pCIP10 y pCLptn, se encontró una banda de aproximadamente 4.5 kb que corresponde con los tamaños esperados; logrando así la subclonación de los genes de interés en el plásmido transbordador pShuttle (Figura 9).



**Figura 9. Ligación de genes de interés en el vector pShuttle.** Carril 1, pCIP10; carril 2, pCIP10; carril 3, pShLptn; carril 4 pShIP10; carril 5, *pShV*. M, Marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 0.8%.

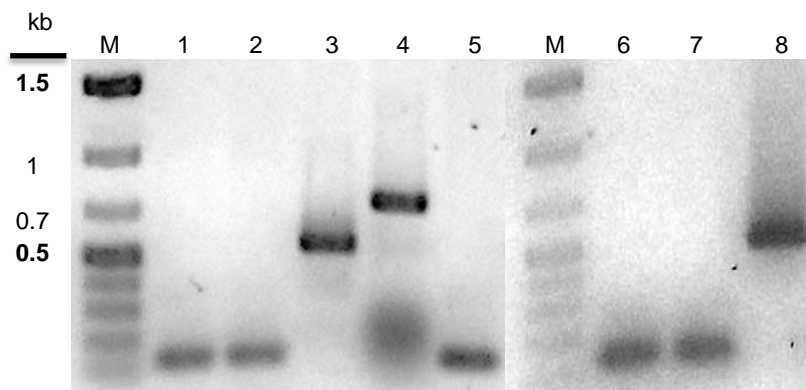
Para caracterizar los genes de interés con el vector pSh se llevó a cabo una digestión enzimática con las enzimas *HindIII* y *XhoI*, liberando las secuencias del gen de interés ligado, de 0.445 kb para IP10 y de 0.490 para Lptn (Figura 10).



**Figura 10. Caracterización de clonas con los genes de interés.** Digestión enzimática con *Hind III* y *Xho I*; Carril 1, pShIP10; 2, pShLptn; M, Marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 0.8%.



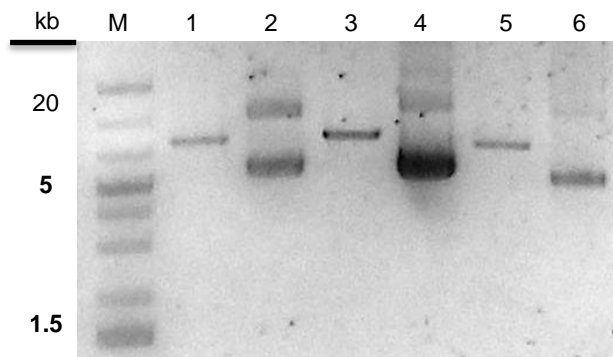
A la par de la caracterización enzimática se realizó un tamizaje por PCR a posibles clonas con los genes de interés. El resultado se corrió en un gel de agarosa en donde se observó que efectivamente algunas de las colonias transformadas con la ligación del gen de interés y el vector pSh presentaron amplificación. Para pShIP10 se presentó una amplificación de 0.570 kb lo cual corresponde con el tamaño del gen insertado de 0.445 kb más una sección del sitio múltiple de restricción de 0.125 kb. Para el plásmido pShLptn se observó una amplificación de 0.616 kb, que corresponde con 0.490 kb del gen de interés más el sitio múltiple de restricción. Como control positivo del ensayo se utilizó el pShFIL el cual tiene un patrón de amplificación de 0.75 kb. El control negativo del ensayo presentó amplificación debida a la presencia del sitio múltiple de clonación de 0.125 kb (Figura 11).



**Figura 11. Tamizaje de clonas ligadas con los genes de interés.** Carriles 1-3, clonas transformadas con la ligación de pSh y Lptn (Carril 3, clona positiva para ligación, amplificación de 0.616 kb); carriles 6-8; clonas transformadas con la ligación de pSh y IP10 (Carril 8, clona positiva para ligación, amplificación de 0.570 kb); carril 4, Control positivo con amplificación del gen de la fusoquina FIL (0.75 kb); carril 5, control negativo. M, Marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 0.8%.

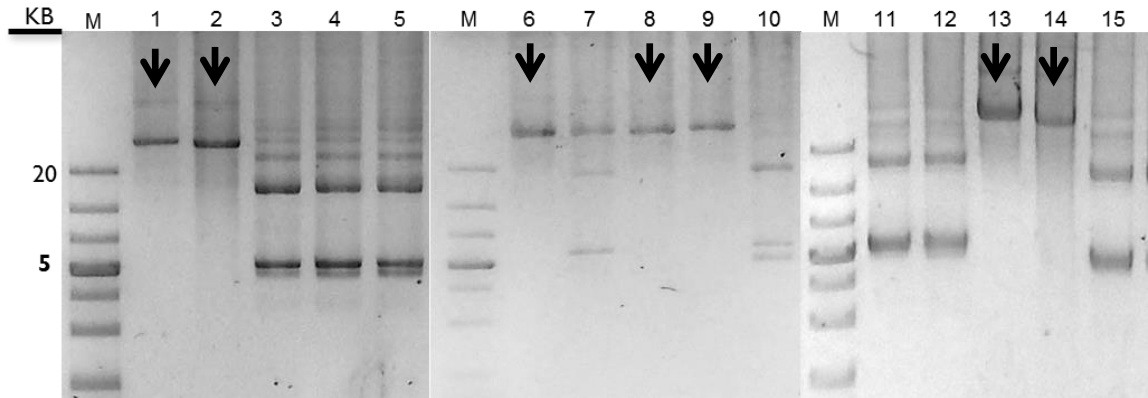
#### 4.1.2. Recombinación homóloga del plásmido pShuttle con el vector AdEasy.

Con el fin de construir el genoma adenoviral recombinante para cada citocina, primeramente se linearizaron los vectores pShIP10 y pShLptn con la enzima *PmeI* (Figura 12). Al correr las digestiones en un gel de agarosa se pudo observar que los plásmidos recién digeridos tenían una única banda de aproximadamente 7.5 kb lo cual corresponde con una digestión completa de los plásmidos.



**Figura 12. Linearización de los vectores pShuttle acarreando los genes de interés.** Digestión con la enzima *Pme I*. Carril 1, pShIP10; carril 3, pShLptn; carril 5, pShV. M: Marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 0.8%.

El producto de cada digestión fue co-transformado en bacterias de la cepa BJ5183 de *E. coli*. Se observó que para al menos 2 de cada 5 colonias levantadas por construcción (pShIP10, pShLptn y pShV) presentaban un DNA plasmídico único con un tamaño aproximado de 34 kb al correrlo en un gel de agarosa (Figura 14); lo cual corresponde con la correcta recombinación de los plásmidos pSh y pAd.



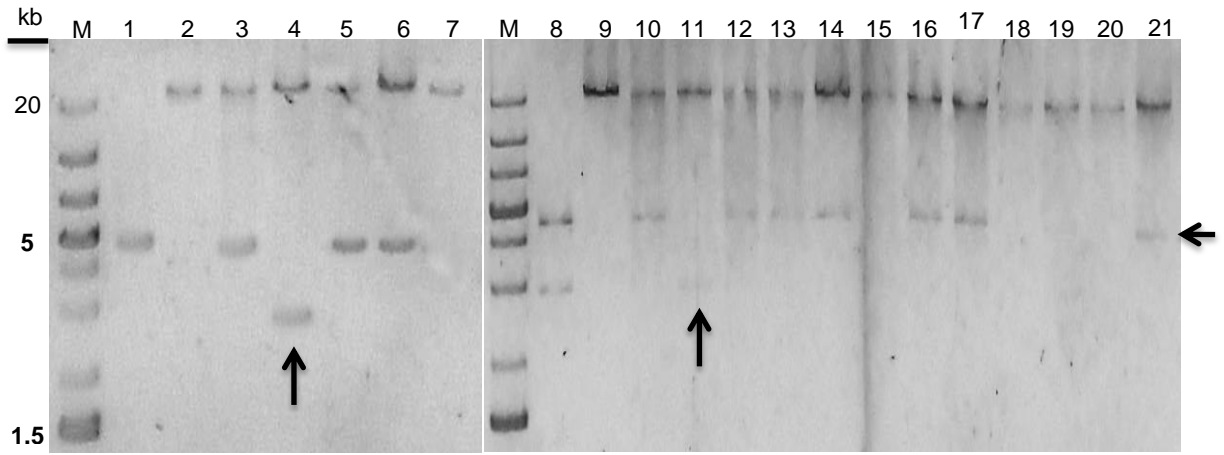
**Figura 13. Obtención de clonas recombinantes de pSh y pAd.** Carriles 1-5, recombinantes pAdIP10; carriles 6-10, recombinantes pAdLptn; carriles 11-15, recombinantes pAdV; M, Marcador de peso molecular 1kb. Las flechas indican las clonas seleccionadas para cada proceso de recombinación. Gel de agarosa al 0.8%.

#### 4.1.3. Caracterización del genoma adenoviral recombinante.

La caracterización del genoma adenoviral recombinante se llevó a cabo realizando una digestión enzimática con la enzima *Pac I*.

Tanto para la construcción del genoma adenoviral pAdIP10 (carriles 3 al 7, Figura 14) como para la construcción del genoma adenoviral pAdLptn (carriles 10 al 15, Figura 14) se pudo observar que de las colonias seleccionadas, el 80% de las clonas fueron positivas para la recombinación; de donde 3 clonas positivas se habían recombinado utilizando los brazos homólogos (caracterizado por la liberación de dos fragmentos un mayor a 20kb y otro de 4.5 kb). Para la construcción del genoma pAdV sólo el 50% de las colonias fueron positivas para la recombinación; todas clonas recombinadas para pAdV

se encuentran utilizando los brazos homólogos para su recombinación (carriles 15 al 21, Figura 14).



**Figura 14. Caracterización de clonas recombinantes.** Carriles 3-7, clonas recombinantes de pAdIP10; carriles 10-15, clonas recombinantes de pAdLptn; carriles 16-21, clonas recombinantes de pAdV; M, Marcador de peso molecular 1 kb. Las flechas indican la liberación de fragmentos de 3 kb y 4.5 kb generados por la recombinación homóloga. Gel de agarosa al 0.8%.

#### 4.1.4. Producción de partículas virales.

Con el fin de producir partículas virales se utilizaron las construcciones del genoma adenoviral recién construidas y caracterizadas para llevar a cabo la transfección de las células HEK293. A las células transfectadas se les realizaron observaciones diarias en busca de efecto citopático (CPE), el cual se observó entre los 7 y 10 días post-transfección para los plásmidos transfectados pAdIP10 (clonas 1 y 2), pAdLptn (clonas 1 y 2) y pAdV. El control positivo del ensayo consistió de la transfección del plásmido pAdGFP, del cual se corroboró que existía expresión de la proteína fluorescente a partir del día 5. El control negativo durante este periodo no presentó efecto citopático (Figura 15).

	Día 1	Día 5	Día 7	Día 10
Control –				
pAdIP10 1				
pAdIP10 2				
pAdLptn 1				
pAdLptn 2				
pAdGFP				
pAdV				

**Figura 15. Proceso de transfección de las células HEK293.** Observaciones de las células HEK transfectadas con los diferentes tratamientos en los días 1, 5, 7 y 10. El control AdGFP se corroboró su expresión a partir del día 5 (10X).

Dado el efecto citopático presentado por las células transfectadas y que el sobrenadante de éstas fue capaz de infectar nuevas células es posible concluir hasta este punto que ya se cuenta con los adenovirus AdIP10 y AdLptn.

#### 4.1.5. Cuantificación de partículas virales.

Utilizando los sobrenadantes infectivos de cada virus se amplificó la infección y se purificaron las partículas adenovirales. Los adenovirus fueron cuantificados con dos métodos: un método físico obteniendo para los diferentes adenovirus valores de entre  $8 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{11}$ ; sin embargo al cuantificar las partículas adenovirales por un método biológico el número de partículas infectivas fue significativamente menor; los valores se presentan en la Tabla 2. Conociendo el título adenoviral obtenido se procedió con los experimentos siguientes utilizando la concentración de  $1 \times 10^6$  por tratamiento, la cuál es la máxima posible a utilizar por la limitación de las partículas adenovirales infectivas.

**Tabla 2. Cuantificación de adenovirus.**

Adenovirus	VP	PFU/ml
<b>AdIP10</b>	$1.13 \times 10^{11}$	$1.6 \times 10^7$
<b>AdLptn</b>	$8.33 \times 10^{10}$	$7.9 \times 10^7$
<b>AdFIL</b>	$1.15 \times 10^{11}$	$7.9 \times 10^6$
<b>AdV</b>	$1.19 \times 10^{11}$	$3.2 \times 10^8$

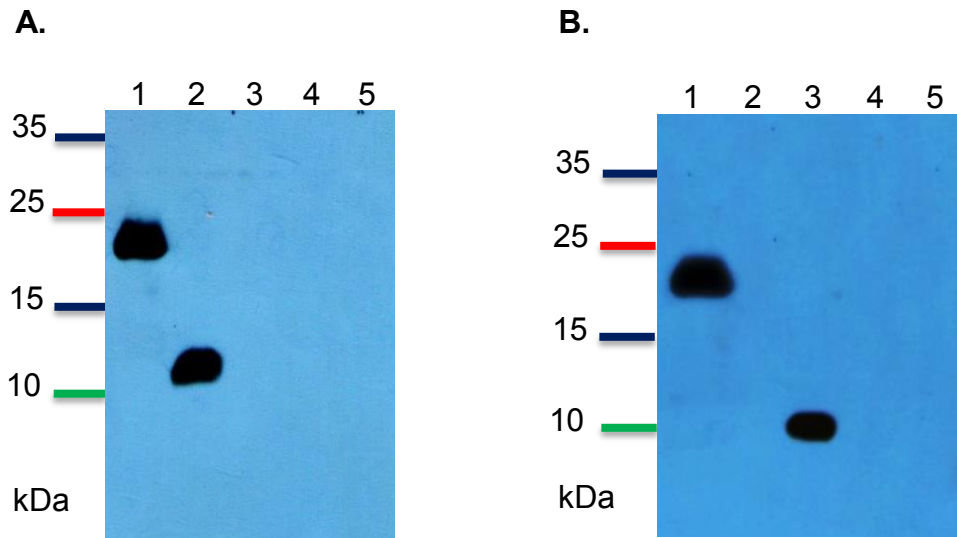
VP, partículas virales obtenidas por el método físico de cuantificación; PFU/ml, Unidades formadoras de placa por mililitro obtenidas por el método biológico.

#### 4.1.6. Los adenovirus recombinantes son capaces de producir las proteínas de interés.

---

Para determinar si los adenovirus recombinantes son capaces de dirigir la expresión de las proteínas de interés IP10 y Lptn, a partir de una infección de células HEK293 se obtuvieron los sobrenadantes los cuales se analizaron mediante Western Blot usando anticuerpos específicos contra IP10 (Figura 16 A) o Lptn (Figura 16 B) humanas. Ambos geles se cargaron de manera idéntica.

La fusoquina FIL se cargó en el carril 1 (Figura 16) funcionando como un control positivo, la cual presenta señal con un peso aproximado a los 22 kDa (Sánchez-Lugo, 2011). La producción de quimiocina por AdIP10 sólo fue detectada en la Figura 16 A; en donde se observó una banda con señal intensa con un peso aproximado a los 10 kDa. Mientras que la producción de la quimiocina por AdLptn solo se detectó en la Figura 16 B, con una señal bien delimitada con un tamaño aproximado a los 12 kDa. Para el experimento se utilizaron dos controles negativos uno conformado por el sobrenadante de células infectadas por el adenovirus vacío y otro conformado por sobrenadante de células sin infectar; ambos controles no fueron detectados por los anticuerpos utilizados. Con este experimento pudimos comprobar que los adenovirus fueron capaces de dirigir la expresión de las proteínas recombinantes.



**Figura 16. Detección de proteínas recombinantes por Western Blot.** Sobrenadantes de células infectadas con: 1, AdFIL; 2, AdIP10; 3, AdLptn; 4, AdV y 5, sobrenadante de células sin infección. Utilizando anticuerpos específicos contra IP10 (A) o Lptn (B) humana.

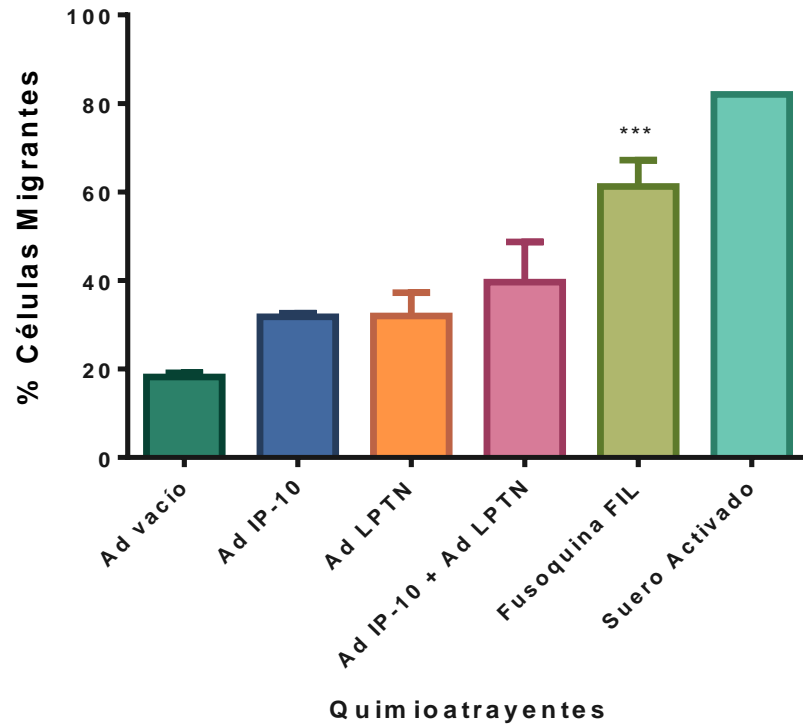
#### 4.2. La proteína quimérica FIL posee actividad biológica *in vitro*.

---

Para conocer si las quimiocinas recombinantes producidas por la infección de los adenovirus recombinantes poseen actividad biológica *in vitro*, se llevó a cabo un ensayo de quimiotaxis. En este ensayo se observó que todos los sobrenadantes de infección obtuvieron algo de quimioatracción *in vitro*; sin embargo, el tratamiento del sobrenadante de infección por el AdFIL obtuvo una atracción mayor comparada con los sobrenadantes de infección de las quimiocinas individuales y combinadas. Esta diferencia fue significativa con una



$p < 0.0001$  en un ensayo de ANOVA para comparaciones múltiples (Figura 17). Con lo cual es posible comprobar que la Fusoquina FIL posee actividad biológica *in vitro*.



**Figura 17. Ensayo de quimiotaxis.** En este ensayo se utilizaron como quimioatrayentes los diferentes sobrenadantes de infección obtenidos a partir de 300,000 células infectadas con  $1 \times 10^6$  PFU/ml. Las células utilizadas fueron linfocitos cultivados en presencia de IL-2 por 21 días.

#### 4.3. La fusoquina FIL posee actividad quimioatrayente en un modelo tumoral *in vivo*.

---

Conociendo que la fusoquina FIL posee actividad biológica *in vitro* es imprescindible conocer si esta actividad permanece en un modelo tumoral *in vivo*. Para demostrar esto primeramente se reprodujo un modelo tumoral y se inmunizó con el antígeno CRT/E7. 7 Días después se administró la terapia adenoviral intratumoral, con los diferentes tratamientos: AdIP10, AdLptn, AdIP10 + AdLptn, AdFIL o AdV. A las 24 y 48 Horas post-tratamiento con los adenovirus se sacrificaron ratones; se disecó el tumor y se procesó por Inmunohistoquímica.

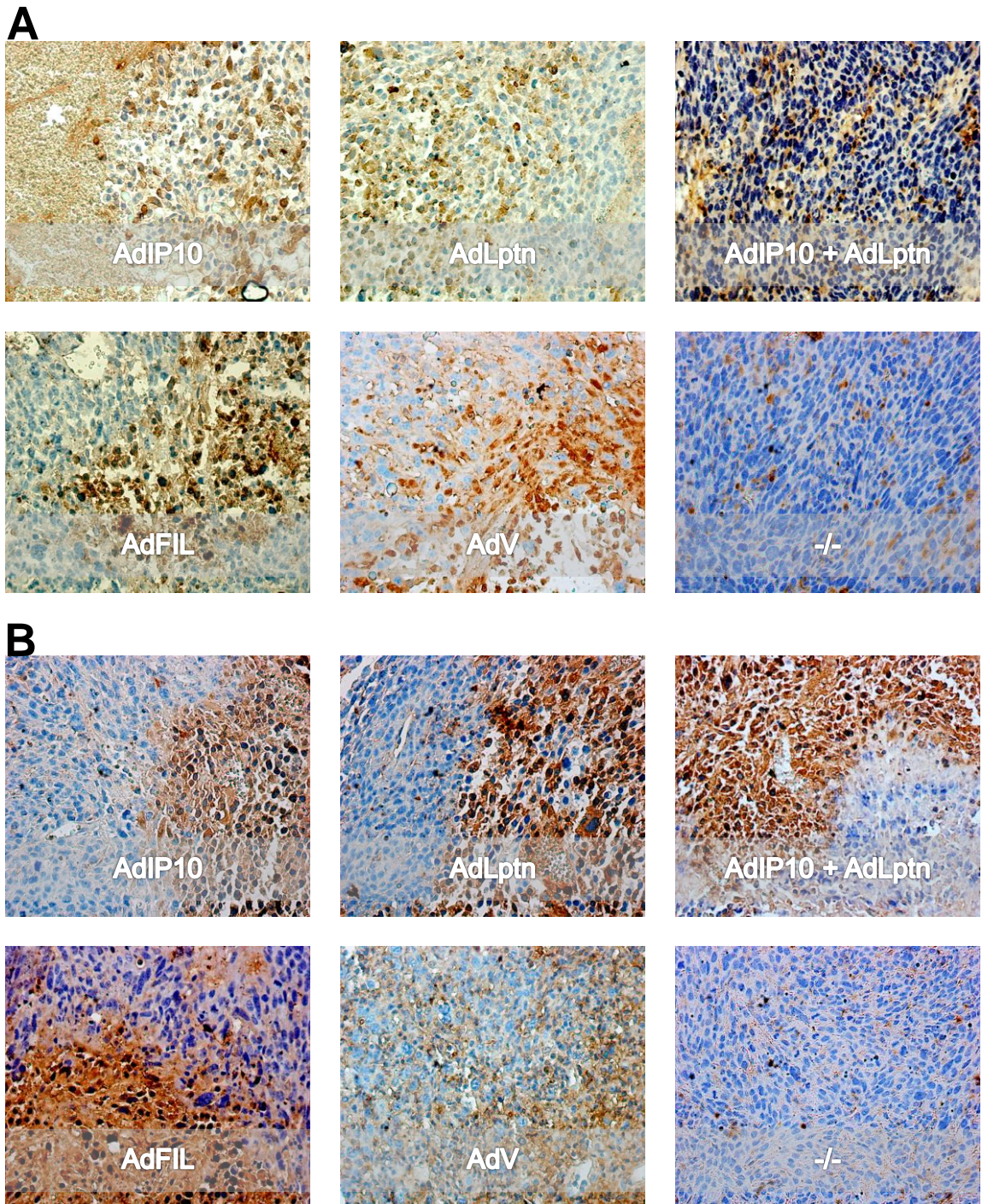
Los cortes de tumores obtenidos se procesaron por Inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti-Hexón con el fin de verificar la presencia e infección del adenovirus inyectado, bajo este ensayo se observó que existían zonas positivas a la cápside viral representadas por células con núcleos teñidos de color azul, con citoplasma y límites celulares teñidos color marrón, esta positividad se observó en diferentes individuos tanto a las 24 y 48 horas siendo positivo como era lo esperado para los tratamientos con los adenovirus: AdIP10, AdLptn, AdIP10 + AdLptn, AdFIL y por AdV. Estas zonas detectadas como positivas podrían ser representativas del sitio de inyección intratumoral (Figura 18.); mientras que como es esperado la positividad no se presentó en los tumores del grupo donde no se administró el tratamiento adenoviral (Grupo -/-).

En los cortes de los tumores procesados por el ensayo de inmunohistoquímica llevado a cabo mediante el uso del anticuerpo anti-CXCR3 (receptor de la quimiocina IP10). Se detectó positividad representada de manera similar que el ensayo anterior, por células con núcleos teñidos de azul; mientras que tanto su citoplasma y límites celulares se tiñeron color marrón. A las 24 horas post tratamiento adenoviral se observó notoriamente esta coloración en diferentes campos de los tratamientos con los adenovirus AdIP10, AdIP10 + AdLptn y AdFIL; mientras que el tratamiento con AdLptn sólo presentó positividad en escasos campos. A las 48 horas post tratamiento adenoviral en diferentes individuos se pudo corroborar lo observado en los individuos sacrificados a las 24 horas, en donde los tratamientos con los adenovirus AdIP10, AdIP10 + AdLptn y AdFIL presentaban positividad en múltiples campos; mientras que el tratamiento con AdLptn presentaba positividad en número menor de campos. Finalmente como era lo esperado el tratamiento con AdV y el grupo -/- no presentó positividad ni a las 24 o 48 horas. Por lo cual se puede aseverar que la citocina IP10 producida por la infección del adenovirus efectivamente es biológicamente activa *in vivo* (Figura 19).

Por último los cortes procesados por el ensayo de inmunohistoquímica mediante el uso del anticuerpo anti-CD16/CD32 (utilizado para marcar células B, NK, cebadas, dendríticas; monocitos/macrófagos y granulocitos); se detectó positividad con dos patrones de coloración, el primero como se había detectado para los otros ensayos por células con núcleos teñidos de azul y con una tinción

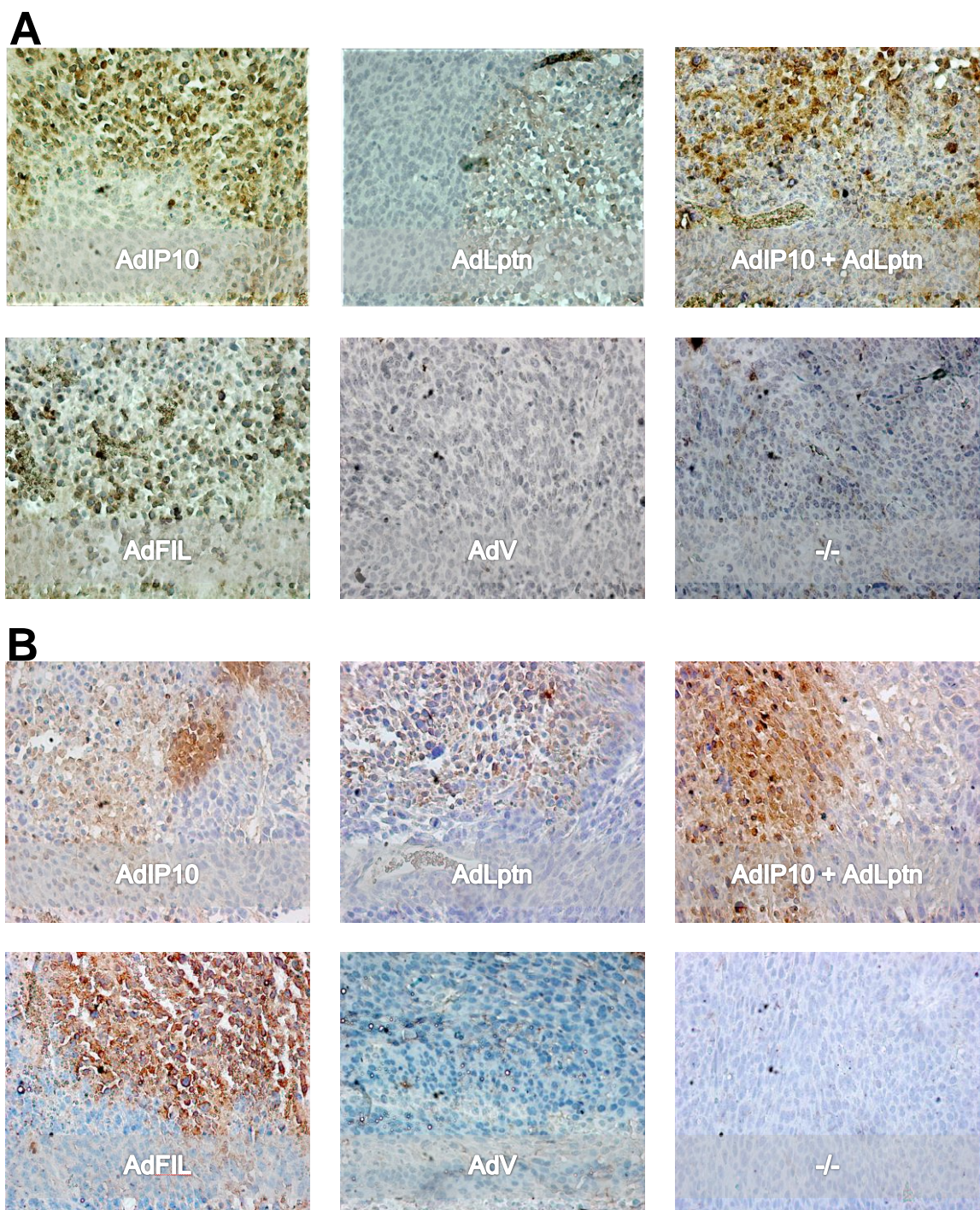
marrón en citoplasma y límites celulares; el segundo patrón de tinción consistió en células teñidas en su totalidad (núcleo, citoplasma y límites celulares) de color marrón. Estos dos patrones de positividad fueron detectados en múltiples campos de diferentes individuos sacrificados a las 24 horas post tratamiento con los adenovirus AdIP10, AdLptn, AdIP10 + AdLptn, AdFIL; mientras que en los tratamientos AdV y grupo -/- sólo fue detectado en escasos campos. A las 48 horas post-administración de los vectores adenovirales en ambos individuos tratados con los adenovirus AdIP10, AdLptn, AdIP10 + AdLptn, AdFIL se presentó la positividad reportada a las 24 horas; sin embargo esta positividad observada 48 horas post tratamiento fue detectada en la mayoría de los cortes y obtuvo además una coloración más intensa. A las 48 horas post tratamiento los controles negativos conformados por la administración de AdV y el grupo -/- la positividad detectada fue escasa (Figura 20).

A continuación se muestran algunas imágenes representativas de cada tratamiento de diferentes individuos a las 24 y 48 Horas. Con ellas es posible determinar que la fusoquina FIL conserva su actividad biológica en un modelo *in vivo*.



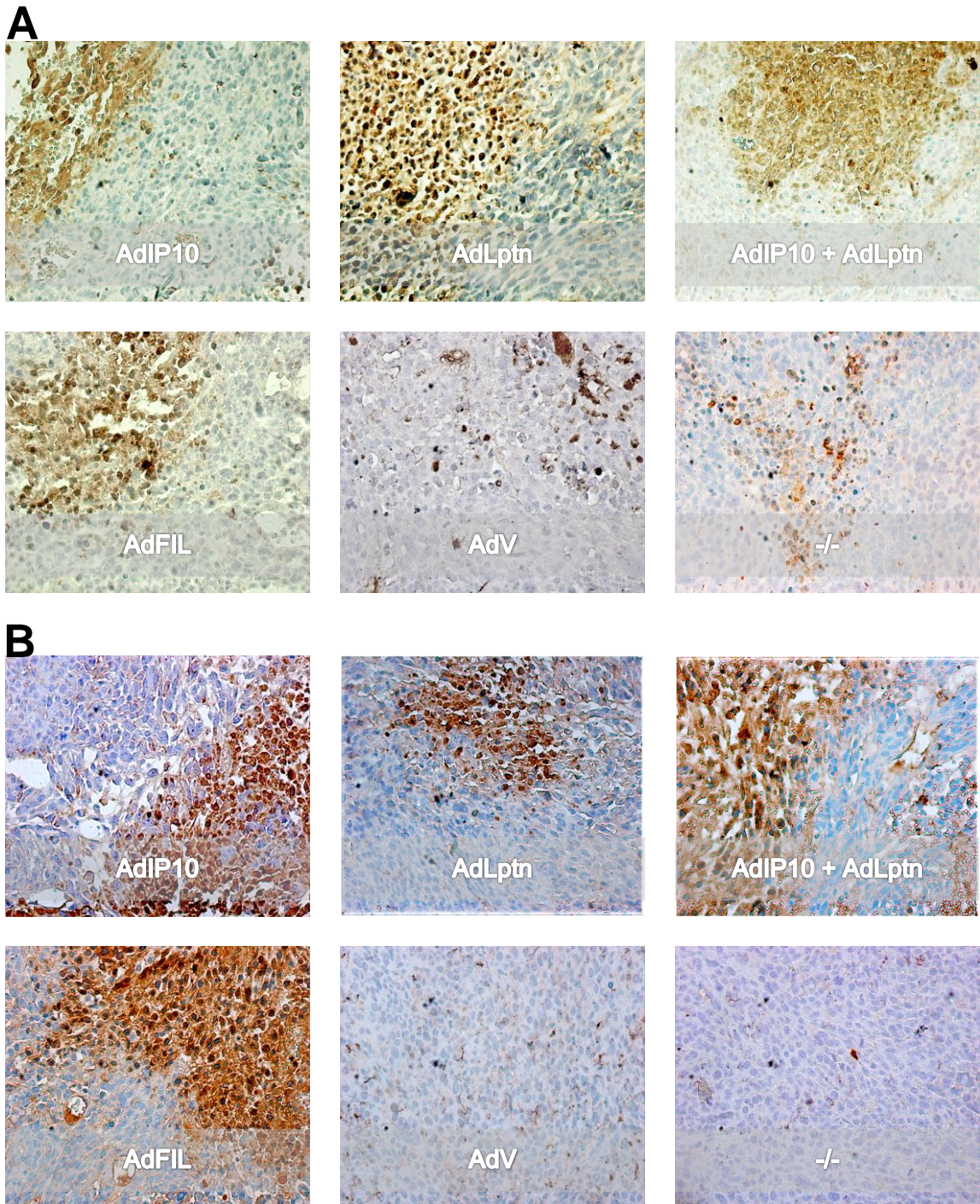
**Figura 18. Detección de la presencia e infección por los vectores adenovirales.** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica anti-hexón, a las A. 24 horas y B. 48 horas post-tratamiento adenoviral. La positividad se evidencio como era esperado en los tratamientos AdIP10, AdLptn, AdIP10 + AdLptn y Adv.





**Figura 19. Quimioatracción de células con receptor de la quimiocina IP10.** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica anti-CXCR3, las 24 horas (A) y 48 horas (B) post-tratamiento adenoviral. La positividad se evidencio en los tratamientos con los adenovirus AdIP10, AdIP10 + AdLptn y AdFIL, tanto a las 24 como 48 horas.



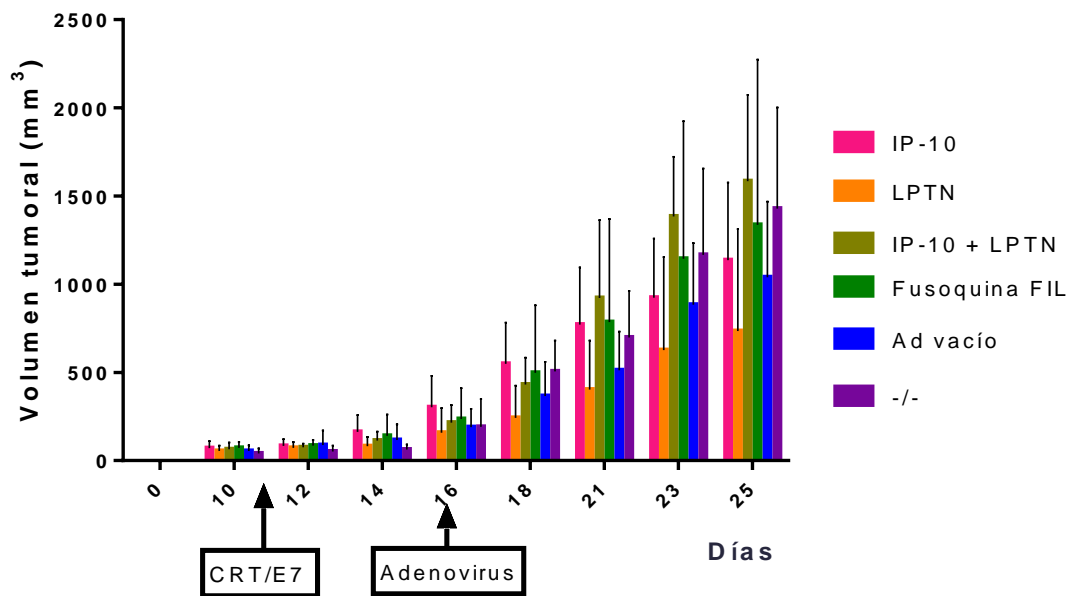


**Figura 20. Quimioatracción de células del sistema inmune positivas a los receptores CD16/CD22.** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica anti-CD16/CD22 (presente en células B, NK, cebadas, dendríticas; monocitos/macrófagos, granulocitos), a las A. 24 horas y B. 48 horas post-tratamiento adenoviral. Evidenciado en los tratamientos con los adenovirus AdIP10, AdLptn, AdIP10 + AdLptn y AdFIL tanto a las 24 como 48 horas.

#### 4.4. Efecto antitumoral de la fusoquina FIL en un modelo murino de cáncer de cérvix.

Finalmente, una vez que se demostró la actividad biológica de la fusoquina FIL, se evaluó el efecto antitumoral de los adenovirus sobre un modelo murino con tumores subcutáneos. La inmunización con el antígeno se llevó a cabo el día 9 post-implante tumoral y el tratamiento con los distintos adenovirus el día 14.

Sin embargo, como se puede observar (Figura 21) no se observó una diferencia significativa en el crecimiento de los tumores en los distintos tratamientos en las condiciones analizadas.



**Figura 21. Evaluación del efecto antitumoral de la fusoquina FIL.** El ensayo se realizó sobre ratones de la cepa C57BL/6 portadores de tumor localizado en el costado derecho, 11 días post-implantación se inmunizó con el antígeno CRT/E7 y 5 días después se administró los tratamientos adenovirales.



## CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.

---

Recientemente las fusoquinas han emergido como una estrategia de potenciar de manera sinérgica los efectos encontrados en tratamientos con citocinas administradas de manera individual o combinada. En el 2004 se probó que las quimiocinas IP10 y Lptn podían ejercer un efecto sinérgico al ser administradas de manera combinada; sin embargo al momento no se conoce el papel que llevarían a cabo estas quimiocinas en el contexto de una fusoquina (Huang y Xiang, 2004).

En el presente trabajo se buscó evaluar la actividad biológica y antitumoral de la fusoquina IP10/Lptn (FIL) expresada por medio de un sistema adenoviral, la cual fue diseñada, construida y caracterizada por nuestro grupo de trabajo (Sánchez-Lugo, 2011). La fusoquina FIL consta de la secuencia de la quimiocina IP10 unida a la quimiocina Lptn por medio de un segmento de unión “*linker*” flexible el cual es constituido por el péptido  $(G_4S)_3$ , este péptido sintético rico en glicinas une de manera efectiva dos moléculas sin afectar la actividad o la estructura tridimensional de cada proteína (Yan *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2012); por lo cual al fusionar proteínas utilizando este linker adquieren una forma similar a lo que tendría una proteína con dos dominios independientes. Estas características le han valido para que haya sido utilizado ampliamente en la construcción de proteínas de fusión (Lode *et al.*, 1998; Acres *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011).

Para evaluar la actividad biológica y antitumoral de la fusoquina primeramente se llevó a cabo la construcción y caracterización de adenovirus control que acarrearán las quimiocinas de manera individual (AdIP10 y AdLptn). El sistema AdEasy (AdEasy vector system, Qbiogene, Inc.) utilizado para la construcción de los adenovirus AdIP10 y AdLptn, es un sistema universalmente utilizado para la generación de partículas virales de tipo no replicativo el cual consta de procedimientos sencillos como lo son: la clonación del gen de interés (Figura 9), la recombinación entre el plásmido acarreador y el plásmido con los genes adenovirales (Figura 13) y finalmente la transfección de los plásmidos recombinados en células permisivas para la formación de adenovirus (Figura 15) (Luo *et al.*, 2007).

Una vez que se contó con los adenovirus se procedió a evaluar la actividad biológica por medio de un ensayo de quimiotaxis en un sistema *in vitro*. Los resultados antes presentados muestran que existe una diferencia significativa entre el porcentaje de linfocitos humanos quimioatraídos por la fusoquina FIL con respecto a sus quimiocinas respectivas administradas ya sea de manera individual o combinada; este resultado corresponde con lo que se ha observado para otras fusoquinas en las cuales se ha potenciado el efecto sinérgico encontrado en la administración de sus citocinas de manera combinada (Acres *et al.*, 2005; Rafei *et al.*, 2011; Williams & Galipeau, 2011). La construcción de la fusoquina FIL es el primer reporte sobre construcción y caracterización de fusoquinas quimiotácticas.

Una posibilidad de que exista este efecto sinérgico potenciado en algunos tratamientos administrados por citocinas fusionadas es la hiperactivación de los receptores de sus citocinas correspondientes, lo cual ya se ha reportado en diferentes estudios (Williams *et al.*, 2010; Penafuerte *et al.*, 2009).

La quimiotaxis *in vivo* de células del sistema inmune del ratón por la presencia de las quimiocinas IP10 y Lptn humanas, de manera individual, ya ha sido reportada (Taub *et al.*, 1996; Yamazaki *et al.*, 2010). En este trabajo, antes de demostrar la quimiotaxis *in vivo* se analizó el efecto quimiotáctico de las tres quimiocinas (IP10, Lptn, FIL) sobre esplenocitos de ratón, observando que efectivamente éstas quimiocinas recombinantes inducen quimioatracción *in vitro* (datos no presentados).

En el presente ensayo de quimiotaxis *in vivo* se analizó la actividad quimiotáctica de la fusoquina IP10/Lptn (FIL) administrada por un sistema adenoviral por vía intratumoral, en este se logró observar que existe quimioatracción de células CXCR3<sup>+</sup> y de células CD16<sup>+</sup>/CD32<sup>+</sup> en los diferentes tratamientos; en los grupos donde se administró la combinación de las quimiocinas individuales (IP10 + Lptn) y donde se administró la fusoquina FIL se observó que la positividad de los receptores antes mencionados fue más evidente. Sin embargo, para poder concluir de manera efectiva la quimiotaxis *in*

vivo mediada por la fusoquina FIL será necesario la búsqueda de otros receptores como el de XCL1, receptor de la fusoquina Lptn; el cuál no fue posible adquirir para este ensayo. Otros marcadores que podrían ser importantes para evaluar si existe una respuesta específica antitumoral podrían ser aquellos que flanquearan linfocitos T citotóxicos activados. Así mismo conociendo la actividad anti-angiogénica de la quimiocina IP10 (Bodnar *et al.*, 2009) será interesante conocer si en el contexto de fusoquina conserva esta actividad; como un dato preliminar es que en los cortes procesados por los tratamientos con los adenovirus AdIP10, AdIP10 + AdLptn y AdFIL se logró observar que los vasos presentaban una distribución y tamaño menor a diferencia de los tratamientos con los adenovirus AdLptn, AdV o el grupo control -/-.

En el ensayo antitumoral realizado en este proyecto no se logró la obtención de regresión tumoral ya reportada por las quimiocinas IP10 y Lptn administradas de manera individual o combinada por sistemas adenovirales (Huang & Xiang, 2004). Esto pudo ser ocasionado por varias causas. Una de ellas podría ser que el tumor creció de una manera descontrolada distinta a la esperada ya que para el día 11 de este ensayo los tumores habían crecido considerablemente más en comparación a los tumores del experimento de quimiotaxis *in vivo*. Por ello fue necesario acortar los tiempos de inmunización y la administración del adenovirus; cambiando el esquema de terapéutico. Otra posible causa es que la dosis de administración de adenovirus fue muy baja comparada con otras

terapias de vectores adenovirales administrando citocinas en donde se han utilizado unidades de PFU/ml en el orden de 2 a  $4 \times 10^9$  (Huang & Xiang, 2004; Zhang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2004).

Por los motivos antes presentados es imposible concluir este objetivo, el cual se deberá repetir; para lo que ya se analiza realizar la implantación del tumor y la inmunización con el antígeno CRT/E7 el mismo día; evitando así problemas relacionados al crecimiento tumoral aquí observados.

A pesar que no se encontró en este estudio resultados favorables para el ensayo antitumoral en las condiciones probadas, es importante mencionar que estas citocinas se encuentran relacionadas con el tratamiento de diferentes padecimientos y por ende tienen potencial terapéutico en otros modelos como lo es la reparación de los discos herniados en donde se encontró que al administrar las quimiocinas IP10 y Lptn obtenidas de manera recombinante, podían inducir la quimioatracción de células del sistema inmune mediando la regeneración del tejido (Hegewald *et al.*, 2012). Así mismo se ha reportado que la administración de Lptn podía mediar el sistema inmune en enfermedades de tipo infecciosas (Yue *et al.*, 2012). Además será interesante investigar si la fusoquina FIL muestra alguna actividad biológica no reportada.

## CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.

---

- Se logró la construcción de los adenovirus recombinantes que expresan las quimiocinas IP10 y Lptn.
- Las quimiocinas producidas por los adenovirus recombinantes IP10, Lptn y la fusoquina FIL tienen actividad quimioatrayente *in vitro*.
- La fusoquina FIL tiene mayor actividad quimioatrayente que sus quimiocinas individuales o combinadas *in vitro*.
- Las quimiocinas producidas por los adenovirus recombinantes IP10, Lptn y la fusoquina FIL tienen actividad quimioatrayente *in vivo* en un modelo tumoral.

## CAPÍTULO 7. LITERATURA CITADA.

---

- Acres B, Gantzer M, Remy C, Futin N, Accart N, Chaloin N, Hoebeke J, Balloul JM, Paul S. 2005. "Fusokine Interleukin-2/interleukin-18, a Novel Potent Innate and Adaptive Immune Stimulator with Decreased Toxicity." *Cancer Research* 65 (20) (October 15): 9536–46.
- Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V. 2005. "Terapia Génica Con Citocinas Contra Cáncer Cervicouterino." *Salud Pública de México* 47 (6) (December): 458–468.
- Bodnar RJ, Yates CC, Rodgers ME, Du X, Wells A. 2009. "IP10 Induces Dissociation of Newly Formed Blood Vessels." *Journal of Cell Science* 122 (June 15): 2064–77.
- Cristillo AD, Macri MJ, Bierer BE. 2003. "Differential Chemokine Expression Profiles in Human Peripheral Blood T Lymphocytes: Dependence on T-cell Coreceptor and Calcineurin Signaling." *Blood* 101 (1) (January 1): 216–25..
- Du G, Liang Y, Zhang G, Dong Q, Liu K, Tian J. 2012. "Human IL18-IL2 Fusion Protein as a Potential Antitumor Reagent by Enhancing NK Cell Cytotoxicity and IFN- $\gamma$  Production." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 138 (10) (October): 1727–36.
- Feldman ED, Weinreich DM, Carroll NM, Burness ML, Feldman AL, Turner E, Xu H, Alexander R. 2006. "Interferon Gamma-inducible Protein 10 Selectively Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Endothelial Cells." *Annals of Surgical Oncology* 13 (1) (January): 125–33.
- Frederick MJ, Clayman GL. 2001. "Chemokines in Cancer." *Expert Reviews* (July): 1–18.
- Furuya M, Tomona Y, Etsuko M, Reiko T, Kiyotaka N, Yohei M, Yoji N, Fumiki H, Yoshiaki I, Ichiro A. 2011. "Differential Expression Patterns of CXCR3 Variants and Corresponding CXC Chemokines in Clear Cell Ovarian Cancers and Endometriosis." *Gynecologic Oncology* 122 (3) (September): 648–55.
- Gao FS, Jing B, Qiang Z, Chong-bo X, Yanmin L. 2012. "Construction of Multiple Recombinant SLA-I Proteins by Linking Heavy Chains and Light

- Chains in Vitro and Analyzing Their Secondary and 3-dimensional Structures.” *Gene* 502 (2) (July 10): 147–53.
- Hegewald AA, Neumann K, Kalwitz G, Freymann U, Endres M, Schmieder K, Kaps C, Thomé C. 2012. “The Chemokines CXCL10 and XCL1 Recruit Human Annulus Fibrosus Cells.” *Spine* 37 (2) (January 15): 101–7.
- Huang H, Bi XG, Yuan JY, Xu SL, Guo XL, Xiang J. 2005. “Combined CD4+ Th1 Effect and Lymphotoxin Transgene Expression Enhance CD8+ Tc1 Tumor Localization and Therapy.” *Gene Therapy* 12 (12) (July): 999–1010.
- Huang H, Li F, Gordon JR, Xiang J. 2002. “Synergistic Enhancement of Antitumor Immunity with Adoptively Transferred Tumor-specific CD4+ and CD8+ T Cells and Intratumoral Lymphotoxin Transgene Expression.” *Cancer Research* 62 (1): 2043–2051.
- Huang H & Xiang J 2004. “Synergistic Effect of Lymphotoxin and Interferon Gamma-inducible Protein-10 Transgene Expression in T-cell Localization and Adoptive T-cell Therapy of Tumors.” *International Journal of Cancer* 109 (6) (May 10): 817–25.
- Jahn T, Zuther M, Friedrichs B, Heuser C, Gohlke S, Abken H, Hombach AA. 2012. “An IL12-IL2-antibody Fusion Protein Targeting Hodgkin’s Lymphoma Cells Potentiates Activation of NK and T Cells for an Anti-tumor Attack.” *PloS One* 7 (9) (January)..
- Kim JW, Hung CF, Juang J, He L, Kim TW, Armstrong DK, Pai SI, Chen PJ, Lin CT. 2004. “Comparison of HPV DNA Vaccines Employing Intracellular Targeting Strategies.” *Gene Therapy* 11 (12): 1011–1018.
- Kroczek RA & Henn V. 2012. “The Role of XCR1 and Its Ligand XCL1 in Antigen Cross-Presentation by Murine and Human Dendritic Cells.” *Frontiers in Immunology* 3 (February) (January): 14. doi:10.3389/fimmu.2012.00014.
- Lee CT, Park KH, Yanagisawa K, Adachi Y, Ohm JE, Nadaf S, Dikov MM, Curiel DT, Carbone DP. 2004. “Combination Therapy with Conditionally Replicating Adenovirus and Replication Defective Adenovirus.” *Cancer Research* 64 (18) (September 15): 6660–5.
- Lei Y & Takahama Y. 2012. “XCL1 and XCR1 in the Immune System.” *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 14 (3) (March): 262–7.



- Li P, Yuan S & Galipeau J. 2013. "A Fusion Cytokine Coupling GM-CSF to IL9 Induces Heterologous Receptor Clustering and STAT1 Hyperactivation through JAK2 Promiscuity." *PLoS One* 8 (7) (January): e69405.
- Liu M, Guo S & Stiles JK. 2011. "The Emerging Role of CXCL10 in Cancer (Review)." *Oncology Letters* 2 (4) (July): 583–589.
- Lode HN, Dreier T, Xiang R, Varki NM, Kang A, Reisfeld RA. 1998. "Gene Therapy with a Single Chain Interleukin 12 Fusion Protein Induces T Cell-dependent Protective Immunity in a Syngeneic Model of Murine Neuroblastoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5) (March 3): 2475–80.
- Loera-Arias MJ. 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". Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Lu J, Peng Y, Zheng ZJ, Pan JH, Zhang Y, Bai Y. 2008. "EGF-IL-18 Fusion Protein as a Potential Anti-tumor Reagent by Induction of Immune Response and Apoptosis in Cancer Cells." *Cancer Letters* 260 (1-2) (February 18): 187–97.
- Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, Sharff KA, et al. 2007. "A Protocol for Rapid Generation of Recombinant Adenoviruses Using the AdEasy System." *Nature Protocols* 2 (5) (January): 1236–47.
- Mizuguchi H & Takao H. 2004. "Target Adenovirus Vectors." *Human Gene Therapy* 15 (November): 1034–1044.
- Penafuerte C, Bautista-Lopez N, Boulassel MR, Routy JP, Galipeau J. 2009. "The Human Ortholog of Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor and Interleukin-2 Fusion Protein Induces Potent Ex Vivo Natural Killer Cell Activation and Maturation." *Cancer Research* 69 (23) (December 1): 9020–8.
- Rafei M, Berchiche YA, Birman E, Boivin MN, Young JK, Wu JH, Heveker N, Galipeau J. 2009. "An Engineered GM-CSF-CCL2 Fusokine Is a Potent Inhibitor of CCR2-driven Inflammation as Demonstrated in a Murine Model of Inflammatory Arthritis." *Journal of Immunology* 183 (3) (August 1): 1759–66.

- Rafei M, Deng J, Boivin MN, Williams P, Matulis SH, Yuan S, Birman E, et al. 2011. "A MCP1 Fusokine with CCR2-specific Tumoricidal Activity." *Molecular Cancer* 10 (1) (January): 121.
- Rocha-Damas C, Caetano-Costa B, Machado-Vieira A, Bruña-Romero O. 2004. "Recombinant Viruses as Tools to Induce Protective Cellular Immunity Against." *International Microbiology* 7 (1): 83–94.
- Russell HV, Strother D, Mei Z, Rill D, Popek E, Biagi E, Yvon E, Brenner M, Rousseau R. 2007. "Phase I Trial of Vaccination with Autologous Neuroblastoma Tumor Cells Genetically Modified to Secrete IL-2 and Lymphotactin." *Journal of Immunotherapy* 30 (2): 227–33.
- Sánchez-Lugo YE. 2011. "‘Construcción de Un Vector Adenoviral Que Expresa La Proteína de Fusión Proteína Inducible Por Interferón 10 / Linfotactina Como Tratamiento Contra El Cáncer Cérvico Uterino’." Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Sato E, Fujimoto J, Toyoki H, Sakaguchi H, Alam SM, Jahan I, Tamaya T. 2007. "Expression of IP-10 Related to Angiogenesis in Uterine Cervical Cancers." *British Journal of Cancer* 96 (11) (July 4): 1735–9..
- Sharma A, Tandon M, Bangari D, Mittal S. 2009. "Adenoviral Vector-based Strategies for Cancer Therapy." *Current Drugs Therapy* 4 (2): 117–138.
- Singh S, Sadanandam A & Singh RK. 2007. "Chemokines in Tumor Angiogenesis and Metastasis." *Cancer Metastasis Reviews* 26 (3-4) (December): 453–67.
- Sun J, Zhao L, Teng L, Lin F, Zhang H, Li Z, Gao Q. 2011. "Solid Tumor-targeted Infiltrating Cytotoxic T Lymphocytes Retained by a Superantigen Fusion Protein." *PloS One* 6 (2) (January): e16642.
- Sun Q, Tyler RC, Volkman BF, Julian RR. 2011. "Dynamic Interchanging Native States of Lymphotactin Examined by SNAPP-MS." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 22 (3) (March): 399–407.
- Swaminathan GJ, Holloway DE, Colvin RA, Campanella GK, Papageorgiou AC, Luster AD, Acharya KR. 2003. "Crystal Structures of Oligomeric Forms of the IP-10/CXCL10 Chemokine." *Structure* 11 (5) (May): 521–532.

- Taub DD, Longo DL & Murphy WJ. 1996. "Human Interferon-inducible Protein-10 Induces Mononuclear Cell Infiltration in Mice and Promotes the Migration of Human T Lymphocytes into the Peripheral Tissues and Human Peripheral Blood lymphocytes-SCID Mice." *Blood* 87 (4) (February 15): 1423–31.
- Williams P & Galipeau J. 2011. "GMCSF-interleukin Fusion Cytokines Induce Novel Immune Effectors That Can Serve as Biopharmaceuticals for Treatment of Autoimmunity and Cancer." *Journal of Internal Medicine* 269 (1) (January): 74–84.
- Williams P, Rafei M, Bouchentouf M, Raven J, Yuan S, Cuerquis J, Forner KA, Birman E, Galipeau J. 2010. "A Fusion of GMCSF and IL-21 Initiates Hypersignaling through the IL-21Ralpha Chain with Immune Activating and Tumoricidal Effects in Vivo." *Molecular Therapy* 18 (7) (July): 1293–301..
- Xia DJ, Zhang WP, Zheng S, Wang A, Pan JP, Wang Q, Zhang LH, Hamada H, Cao X. 2002. "Lymphotactin Cotransfection Enhances the Therapeutic Efficacy of Dendritic Cells Genetically Modified with Melanoma Antigen Gp100." *Gene Therapy* 9: 592–601.
- Yamazaki C, Miyamoto R, Hoshino K, Fukuda Y, Sasaki I, Saito M, Ishiguchi H, et al. 2010. "Conservation of a Chemokine System, XCR1 and Its Ligand, XCL1, Between Human and Mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397 (4) (July 9): 756–61..
- Yan W, Imanishi M, Futaki S, Sugiura Y. 2007. "Alpha-helical Linker of an Artificial 6-zinc Finger Peptide Contributes to Selective DNA Binding to a Discontinuous Recognition Sequence." *Biochemistry* 46 (29) (July 24):
- Yang LL, Wang BQ, Chen LL, Luo HQ, Wu JB. 2012. "CXCL10 Enhances Radiotherapy Effects in HeLa Cells through Cell Cycle Redistribution." *Oncology Letters* 3 (2) (February): 383–386.
- Yue Y, Xu W & Xiong Y. 2012. "Modulation of Immunogenicity and Immunoprotection of Mucosal Vaccine Against Coxsackievirus B3 by Optimizing the Coadministration Mode of Lymphotactin Adjuvant." *DNA and Cell Biology* 31 (4) (April): 479–88. doi:10.1089/dna.2011.1367.
- Zhang J, Zhou Z, Wang C, Shen J, Zheng Y, Zhang L, Wang J, Xia D. 2011. "Reduced Tumorigenesis of EG7 after Interleukin-10 Gene Transfer and Enhanced Efficacy in Combination with Intratumorally Injection of

Adenovirus-mediated Lymphotoxin and the Underlying Mechanism.”  
*Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 60 (4) (May): 559–73.

Ziegler M, Elvers M, Baumer Y, Leder C, Ochmann C, Schönberger T, Jürgens T, et al. 2012. “The Bispecific SDF1-GPVI Fusion Protein Preserves Myocardial Function after Transient Ischemia in Mice.” *Circulation* 125 (5) (February 7): 685–96..

Zinser E, Rössner S, Littmann L, Pangratz N, Schuler G, Steinkasserer A. 2012. “The IL-2 Diphtheria Toxin Fusion Protein Denileukin Diffitox Modulates the Onset of Diabetes in Female Nonobese Diabetic Animals in a Time-dependent Manner and Breaks Tolerance in Male Nonobese Diabetic Animals.” *Journal of Immunology* 189 (3) (August 1): 1173–81.