CONSTRUCCIÓN DE UN ADENOVIRUS RECOMBINANTE PARA LA TERAPIA

DAVID JULIÁN SALAMANCA VALERO

Trabajo de grado para optar por el título de licenciado en biología

Directora: Carmen Helena Moreno Durán. Bióloga y magíster en Ciencias Biológicas.

Directora externa: Josefa Antonia Rodríguez García. Microbióloga y magíster en Microbiología

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

BOGOTA D.C. 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a la Universidad Distrital Francisco José de Caldas por formarme como profesional, al Instituto Nacional de Cancerología y al grupo de Investigación en Biología del Cáncer por abrirme sus puertas y brindar los recursos para la realización de este trabajo de grado.

A la profesora Josefa Antonia rodríguez por permitirme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por su permanente acompañamiento y asesoramiento en todo este proceso con su conocimiento y constantes consejos, no sólo como profesora, sino como ser humano, además, porque no sólo es el aporte académico, también por su paciencia, sus regaños y cariño brindado en mi proceso de aprendizaje. A Olga Cristina Lozano y Wendy Johana Montero del Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, tanto por sus consejos, como por sus enseñanzas en técnicas de laboratorio que me permitieron corregir tropiezos presentados. A la profesora Carmen Helena de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas por su amabilidad y permitir el vínculo con la universidad.

Finalmente, este trabajo no requirió sólo aporte intelectual, sino también personal, agradezco a mi familia por todos los esfuerzos y acompañamiento brindado, tanto en momentos de alegría como en momentos de tristeza. A mis amigos, por ser parte fundamental del proceso, por las risas, por su apoyo tanto directo como indirecto al realizar este trabajo y, por último, pero no menos importante, a Wendy Rosas, por su apoyo moral y emocional en todo momento a lo largo de este proceso. Porque sin todos ustedes, esto no habría sido posible, muchas gracias.

RESUMEN

A pesar de los avances en terapias tradicionales como la radioterapia o la quimioterapia, no se observa una mejora significativa en la supervivencia de los pacientes con cáncer, por lo cual se han venido ensayando diferentes métodos de inmunoterapia basados en la estimulación del sistema inmunológico para que sea él, el que destruya el tumor. Muchas de estas terapias dependen de la activación de los linfocitos T, sin embargo, para que esto suceda, los péptidos tumorales deben ser presentados en moléculas de HLA-I, a los linfocitos T citotóxicos. Uno de los mecanismos de evasión más comúnmente usado por los tumores para escapar a la respuesta inmune antitumoral, es la expresión alterada de estas moléculas presentadoras de antígeno en la superficie de las células tumorales, de manera que la regulación negativa o la pérdida total de la expresión de esta molécula en la superficie de las células tumorales puede anular el efecto clínico de las inmunoterapias basadas en la activación de los linfocitos T. En este estudio se construyeron los genomas adenovirales recombinantes para los alelos HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02 del complejo mayor de histocompatibilidad clase I con el fin de generar adenovirus recombinantes defectivos de replicación, por trans complementación en células Ad 293. Estos vectores adenovirales se proponen cómo una terapia génica neoadyuvante de la inmunoterapia contra el cáncer.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN ..... **III**
LISTA DE ABREVIATURAS VI
LISTA DE FIGURAS VII
LISTA DE TABLAS IX
INTRODUCCIÓN 10

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 12
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 13
3. ANTECEDENTES 14
4. JUSTIFICACIÓN 15
5. OBJETIVOS 17
5.1 Objetivo general 17
5.2 Objetivos específicos 17
6. MARCO TEÓRICO 18
6.1 Generalidades del cáncer 18
6.2 HLA (Human Leukocyte antigen) 19
6.3 Terapia génica 21
6.4 Agentes virales en la terapia génica 23
6.5 Inmunoterapia en el cáncer 24
6.6 Terapia génica en el tratamiento del cáncer 25
6.7 El cáncer y la vigilancia inmunológica 27
7. METODOLOGÍA 29
7.1 Determinar las condiciones óptimas del cultivo celular para las células ad293 29
7.2 Construcción de los esqueletos adenovirales recombinantes para los genes que codifican HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02 31
7.2.1 Amplificación, secuenciación y clonación de los genes que codifican HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02 32
7.2.2 Secuenciación sanger de los genes amplificados 35
7.2.3 Clonación de los genes HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02 40
7.2.4 Transformación de las bacterias DH5α 44

7.2.5 Transformación de las líneas celulares BJ5183.....45

7.2.6 Cuantificación de los productos de PCR.....48

7.3 Transfección de las células ad 293.....50

8. RESULTADOS.....51

8.1 Determinar las condiciones óptimas del cultivo celular para las células ad293.....51

8.2 Construcción de los esqueletos adenovirales recombinantes para los genes que codifican HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02.....53

8.2.1 Amplificación, secuenciación y clonación de los genes que codifican HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02.....53

8.2.2 Cuantificación de los plásmidos pAd1-CMV-HLA-B*44:02.....60

8.3 Transfección de las células ad 293.....62

9. CONCLUSIONES.....64

10. ANEXOS.....65

11. BIBLIOGRAFÍA.....66

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
ARNm	ARN mensajero
CMV	Citomegalovirus
CTL	Linfocito T Citotóxico
DC	Células dendríticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
HLA	Antígeno leucocitario humano
HLA-I	Antígeno leucocitario humano de clase I
HLA-II	Antígeno leucocitario humano de clase II
Kan	Kanamicina
LB	Caldo LB (Luria Bertani)
LOH	Pérdida de heterocigosis
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NK	Natural killer
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
TCR	Receptor de células T
β2m	β_2-microglobulina
TAP	Transporter associated with antigen processing

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 índice de mortalidad de cáncer a nivel mundial al año 2018, modificado de (GLOBOCAN, 2018).

Fig. 2 Molécula de HLA-I, tomado de Inmunología celular y Molecular, Abul K. Abbas, (2015)

Fig. 3 genes codificadores de las moléculas de HLA, está situada en la región del CMH, cromosoma 6.

Fig. 4 nucleótido en una secuencia de lectura, se puede observar en la imagen de la izquierda como al perder el oxígeno del grupo hidroxilo, no se puede adherir el grupo fosfato del siguiente nucleótido

Fig. 5 disposición de la lectura de los nucleótidos en un electroferograma

Fig. 6 Acción de la enzima de restricción EcorI

Fig. 7 recombinación homóloga entre el pShuttle-CMV con el inserto y el vector pAdEasy-1, se observan los brazos de homología en donde ocurre la recombinación.

Fig. 8 corte de la enzima de restricción PacI

Fig. 9 diferencia de la viabilidad celular al cabo de una semana por diferentes métodos de descongelamiento. A. Método de descongelamiento donde se lleva directamente del tanque de N_2 líquido a la caja de cultivo. B. Método al que se le aplica un choque térmico de 37°C y retiro del crioprotector**.**

Fig.10 Amplificación de los alelos HLA-I a partir de los plásmidos pLNCX Columnas 1 y 2: alelos HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02 respectivamente, columna 3: Marcador de peso molecular.

Fig. 11 DNA purificado y amplificado. a) Banda correspondiente al producto de PCR previo a la purificación de banda b) Banda correspondiente al producto de PCR después de la purificación de banda, la intensidad de la banda es mayor..

Fig. 12 Electroferograma indicando la disposición de los nucleótidos en la secuencia HLA-B*44:02.

Fig. 13 Blast de la secuencia del gen HLA-B*44:02 (secuencia de HLA-B) con una secuencia consenso (HLA-B teórica), permite observar la homología entre ambas secuencias.

Fig. 14 Presencia del gen de HLA-B en células DH5α, la amplificación obedece al gen inserto en el sitio de multiclonaje del pShuttle-CMV, su suma nos va a dar un aproximado de 1500pb.

Fig. 15 PCR específica para HLA-B*44:02

Fig. 16 PCR dúplex, con los cebadores 1, 2, 3 y 4 de la tabla... que anillan en un sector del pAdEasy1, amplificando un fragmento de aprox. 350pb y en un sector del pShuttle donde amplifica un fragmento de aprox. 780pb.

Fig. 17 Comparación de las células antes y después de la transfección. A.) Células con precipitado granular. B.) Células en estado de crecimiento normal.

LISTA DE TABLAS

Tab. 1. Volúmenes de reactivos para la reacción de PCR convencional por 1 µl

Tab. 2 perfil térmico de la PCR convencional

Tab. 3 cebadores usados para amplificar los genes de HLA.

Tab. 4 volúmenes estándar de los reactivos para la mezcla de la reacción para la secuenciación

Tab. 5 protocolo de la PCR para la secuenciación

Tab. 6 sitios de corte de enzimas de restricción HindIII y XhoI, presentando un corte con extremos cohesivos.

Tab. 7 concentración de los reactivos utilizados para llevar a cabo la reacción de la digestión enzimática del plásmido pShuttle y los genes a insertar.

Tab. 8 concentración de reactivos usados para la ligación de los productos de la digestión.

Tab. 9 concentración de reactivos usados para linealizar el plásmido pShuttle-CMV-HLA-B*44:02

Tab. 10 volúmenes usados para la transformación de las células BJ5183

Tab. 11 cebadores usados para la PCR convencional.

Tab. 12 concentración de reactivos usados para la digestión del plásmido pAd1-CMV-HLA-B*44:02

Tab. 13 cuantificación por el método de Qubit

Tab. 14 cuantificación por el método de Nanodrop 2000

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que presenta un crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. Durante los estadios tumorales, las células van acumulando mutaciones que les provee ventajas para su crecimiento, proliferación, invasión local y a distancia. Una de estas características es la facultad de evadir la respuesta inmune evitando su destrucción, que se da debido al escape de células tumorales de ser reconocidas por las células del sistema inmunológico Chen DS & Mellman I, 2017). En su fase inicial las células tumorales van a presentar péptidos antigénicos, fragmentos de proteínas citosólicas defectuosas degradadas en el proteosoma de la célula. Estos péptidos que son asociados a tumor, serán procesados y posteriormente presentados en una molécula de HLA de clase I en la superficie de la célula a los linfocitos T citotóxicos (CTL), células pertenecientes a la inmunidad celular con una alta especificidad de ataque, que se encargarán de llevar estas células a una muerte celular por medio de apoptosis (Abbas, 2015). Sin embargo, se observa pérdida o regulación negativa de la expresión de estas moléculas proporcional al progreso del tumor, mecanismo que se ha encontrado en una gran cantidad de células tumorales y, por lo tanto, siendo objetivo clínico la recuperación de la expresión de HLA. Varias metodologías se han desarrollado con el fin de recuperar la expresión de HLA-I, involucrando el tratamiento con citoquinas e incluso la transferencia de genes que codifiquen para algunas proteínas que medien el procesamiento y presentación de péptidos antigénicos, como β2-microglobulina (β2m) y TAP (del inglés Transporter associated with antigen processing) asociada al transporte peptídico, logrando así, restablecer la respuesta inmune perdida, estudios que han permitido demostrar el restablecimiento de la molécula de HLA-I en la superficie de la célula (Del Campo *et al*., 2014).

Los estudios enfocados en la transferencia de genes que estaban mediados por métodos no virales, no tenían una eficiencia de transfección esperada, por lo que actualmente el enfoque se basa en sistemas virales, como los adenovirus, retrovirus entre otros, los cuales han presentado mejores resultados a la hora de transferir el gen. Sin embargo, son nulos los ensayos de transferencia del gen que expresa la cada pesada de HLA-I, molécula de vital importancia en la presentación de antígenos, gracias a su variedad alélica que muestra especificidad y variedad de unión a los péptidos antigénicos (De León, 2018).

En este trabajo propone una metodología para la construcción de un adenovirus recombinante que sirva como vehículo para portar el gen que codifica para la cadena de la molécula HLA-I (HLA-B*44:02) para en posteriores ensayos clínicos transferir este gen a células de cáncer de cuello uterino SiHa que carece de este alelo, empleando la recombinación homóloga entre el plásmido pShuttle-CMV que tiene en su genoma tanto el gen de HLA-I como el promotor del citomegalovirus que es un promotor fuerte para su expresión y el vector adenoviral pAdEasy-1, esqueleto del adenovirus, que carece del gen E1 y E3, permitiendo así el espacio apropiado para la inserción del pShuttle.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Varios métodos de inmunoterapia para combatir el cáncer están basados en la administración de péptidos que se deben presentar en moléculas de HLA-I a los CTL, por ello, la regulación negativa o pérdida total, afecta su funcionamiento en la salud humana, por lo que es importante restablecer su expresión normal en las células tumorales, si estos daños impiden esa presentación de los antígenos tumorales, así, esta manera, restituir la inmunogenicidad del tumor (Rodríguez *et al.*, 2014).

Se ha descrito que las alteraciones en la expresión de HLA-I ocurren de manera temprana y son comunes en una gran variedad de tumores humanos, con porcentajes que oscilan entre el 60 y el 90%, causadas predominantemente por aberraciones genéticas en 6p21.3 y 15q21. Al menos el 50% de la pérdida alélica en HLA es causada por pérdidas de heterocigosis (LOH, por loss of heterozygosity), un mecanismo frecuente de pérdida de la expresión de alelos HLA en tumores humanos y la pérdida total de la expresión de HLA-I ocurre con frecuencia debido a la existencia de dos eventos moleculares: la mutación de un gen β2m y la pérdida de la segunda copia por LOH, los cuales han conllevan a varios tipos de malignidad (Rodríguez, 2017).

El sistema inmunológico adaptativo desempeña un papel fundamental en la vigilancia para el control del desarrollo tumoral, el cual es mediado por el reconocimiento de péptidos alterados en la superficie de la célula tumoral, por parte de un linfocito T (LT) citotóxico CTL, (del inglés cytotoxic T lymphocyte). Estos péptidos alterados deben ser presentados en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA en humanos), de clase I (HLA-I) para ser reconocidos por el receptor de los LT (TCR, de T-cell receptor) una vez reconocido el antígeno

presentado en HLA-I por el TCR de los CTLs, se desencadena una respuesta inmunológica citotóxica mediada por los CTLs, que controla de desarrollo tumoral (Abbas, 2015). Por otra parte, la secreción de citocinas inmunosupresoras y la infiltración de células inmunosupresoras en la masa tumoral son otros mecanismos comúnmente usados por el tumor para evadir la inmunidad. Lo anterior resalta la importancia de la correcta expresión de HLA en las células tumorales para garantizar la vigilancia inmunológica antitumoral, y es por ello que la regulación negativa o la pérdida de expresión de HLA-I es el mecanismo de evasión más comúnmente utilizado por los tumores para escapar a la vigilancia y destrucción inmunológica (Najafimerh, h., 2020).

Dado que la terapia génica es una metodología que ha generado buenos resultados, ya que ha demostrado el restablecimiento parcial o total de otras moléculas que se han perdido por daños genéticos, se propone la construcción de un adenovirus recombinante que pueda portar en su DNA el gen de HLA-I, que en futuros ensayos clínicos, lleguen a ser útiles como terapia neo adyuvante a la inmunoterapia basada en activación de linfocitos T para incrementar la respuesta clínica a terapias contra el cáncer.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible utilizar adenovirus recombinantes para restablecer la expresión normal de los alelos HLA en la superficie de células tumorales con un fenotipo HLA alterado?

3. ANTECEDENTES

A partir de los años 70 se desarrollaron herramientas de biología molecular e ingeniería genética mediante el desarrollo de técnicas del DNA recombinante, entre estas herramientas se encuentra la terapia génica, que es una técnica innovadora la cual permite corregir una alteración molecular modificando así la evolución de la enfermedad a tratar (Anderson, 2000). Las primeras pruebas de terapia génica se remontan a 1980, cuando Martin Cline trató de curar dos pacientes con talasemia aplicando esta técnica sin autorización (Vélez y Sánchez, 2013). En 1990 se utilizó la terapia génica para tratar la deficiencia de adenosina desaminasa, que causa la inmunodeficiencia severa mixta, caracterizada por linfopenia de células T, con o sin deficiencia de células B y en ocasiones con deficiencias de células NK donde los pacientes son susceptibles a infecciones de todo tipo. (Contreras-Verduzco *et al*., 2014). En Francia, niños con SCID, pudieron vivir en un ambiente normal gracias a la transferencia ex-vivo de células autólogas con la versión silvestre del gen afectado.

En los 90 's hubo un auge de la terapia génica a nivel mundial, se desarrollaron más de 400 ensayos clínicos, inicialmente para enfermedades monogénicas y luego se extendió su aplicación a enfermedades complejas como el cáncer (Castellanos y Sangro, 2005). Sin embargo, se presentó la muerte de un joven como consecuencia del procedimiento, y dos niños desarrollaron leucemia aguda debido a la activación de un oncogén a causa de la inserción aleatoria del material genético terapéutico en el genoma de las células corregidas (Castellanos y Sangro, 2005). Por lo expuesto anteriormente, prendieron las alarmas acerca de la ética del uso de esta técnica en ensayos clínicos (Vélez y Sánchez, 2013). En la actualidad, las terapias génicas para el cáncer se realizan con agentes virales y no virales. Los agentes virales más empleados son

los adenovirus, por sus características, como son, por ejemplo: la capacidad de infectar una amplia gama de tipos de células, además que la infección no va a depender de la división activa de la célula huésped. También pueden obtenerse títulos de virus elevados y un alto nivel de expresión génica, que son consideraciones importantes para las técnicas de producción de proteínas en células de mamíferos, lo que hacen los adenovirus, ideales para la transferencia génica segura en pacientes con cáncer (Rodríguez, *et al.*, 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo y se calcula que cada año se presentan 11 millones de nuevos casos y cerca del 70% de las muertes se registran en países de ingresos medios y bajos (WHO, 2018). Se estima que los nuevos casos anuales pasen de aproximadamente 14 millones en 2012 a más de 20 millones en 2030 y casi dos tercios de esos casos se darán en países menos desarrollados (Barrios & Garau, 2017). Además, para el año 2030, se calcula que morirán más de 13.1 millones de personas por esta enfermedad y su costo para el sistema de salud es enorme, con un gasto aproximado de un billón de pesos anuales (Salazar y Sánchez, 2014). A pesar de los avances en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer, las tasas de mortalidad por esta enfermedad continúan siendo altas. Lo anterior resalta la importancia de explorar nuevas estrategias terapéuticas tales como la inmunoterapia que ha demostrado ser una alternativa viable y promisoria para el tratamiento del cáncer.

La mayoría de las inmunoterapias buscan estimular el sistema inmunológico mediante la activación de los linfocitos T para que sea este mismo el encargado de destruir las células tumorales. Sin embargo, para que el linfocito T pueda activarse, su receptor de célula T (TCR) debe reconocer un péptido antigénico (en este caso, un antígeno asociado a tumor (TAA), presentado en una molécula de HLA. Dado que el principal mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica utilizado por el tumor es la pérdida o regulación negativa de la expresión de HLA-I (Garrido *et al*. 2016), en la superficie de las células tumorales. De esta manera, se postula que la transferencia génica de HLA-I utilizando un adenovirus recombinante podría ser útil para restablecer la expresión de la molécula en la superficie de las células tumorales (Rodríguez *et al*. 2014) para que puedan presentar los antígenos tumorales a los linfocitos T citotóxicos (Carretero *et al.*, 2013).

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Construir un adenovirus recombinante para restablecer la expresión de HLA-I en células tumorales.

5.2 ESPECÍFICOS

Determinar las condiciones óptimas del cultivo celular para el crecimiento de las células ad 293.

Construir los esqueletos adenovirales recombinantes para los genes que codifican HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02

Producir el adenovirus recombinante en células Ad-293.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 Generalidades del cáncer

El cáncer es una enfermedad genética de origen monoclonal, caracterizada por la acumulación secuencial de mutaciones en una célula que le confiere una ventaja de supervivencia sobre las células normales (Sánchez, 2013), un proceso multifactorial que tiene como consecuencia la transformación de células normales en células tumorales por la adquisición secuencial de mutaciones que dan origen a una lesión precancerosa que progresa a cáncer *in situ* y a cáncer invasor. La célula que sufre la transformación maligna se multiplica sin control y de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia, que empiezan debido a mutaciones que activan los controladores oncogénicos. Proceso, que por lo general sucede simultáneamente con activaciones o inactivaciones genéticas o no genéticas de genes que suprimen o promueven el crecimiento tumoral (Chen DS & Mellman I, 2017).

Esta enfermedad, es tan antigua como el hombre, y su incidencia y mortalidad se vienen incrementado en todo el mundo. Esta enfermedad es la segunda causa de muerte en todo el mundo; en 2015 se presentaron 8,8 millones de muertes por cáncer en todas sus localizaciones. Los cinco tipos de cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial son, el de pulmón (1.690.000), hígado (788.000), colon -Recto (774.000) estómago (754.000) y mama (571.000) (WHO, 2018).

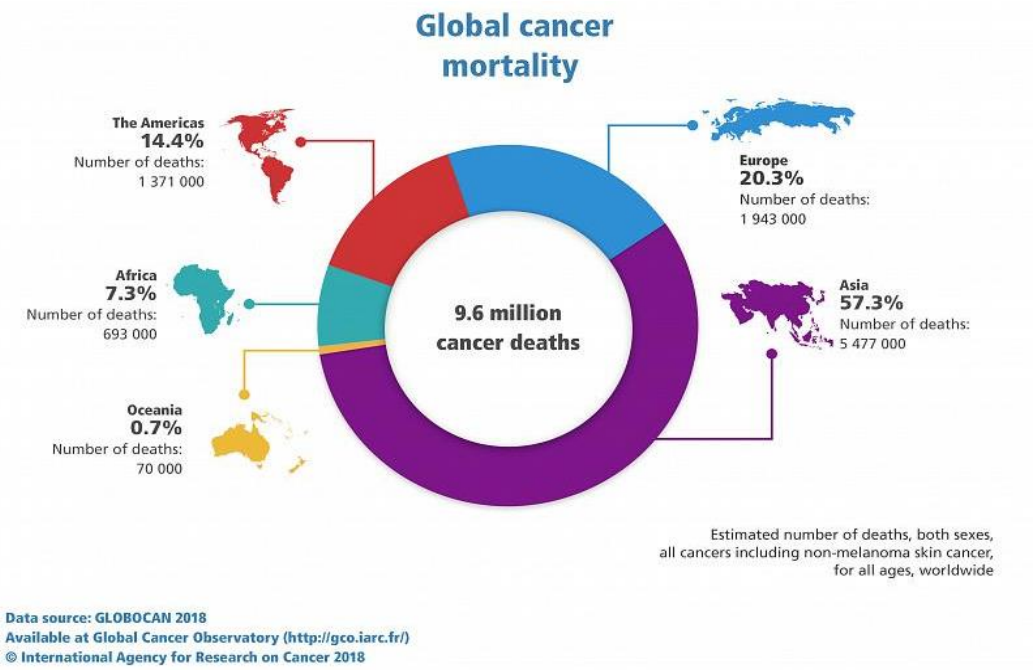


Fig. 1 índice de mortalidad de cáncer a nivel mundial al año 2018, modificado de (GLOBOCAN, 2018).

6.2 HLA (Human leukocyte antigen)

Las moléculas de HLA-I o antígeno de los leucocitos humanos de clase I son moléculas encargadas de presentar los antígenos endógenos a los linfocitos T citotóxicos, para que ejerzan su función de vigilancia inmunológica . Si los péptidos presentados en moléculas de HLA-I sobre la superficie celular están alterados, los CTL se activan y eliminan la célula que los está presentando en sus moléculas de HLA-I. Estos péptidos alterados pueden corresponder a proteínas de un parásito intracelular o a una célula tumoral que por la acumulación de mutaciones expresa proteínas alteradas en sus moléculas de HLA-I. Las células tumorales con frecuencia presentan una expresión alterada de HLA-I para evadir los mecanismos de control inmunológico y favorecer el desarrollo tumoral (Carretero *et al.*, 2013).

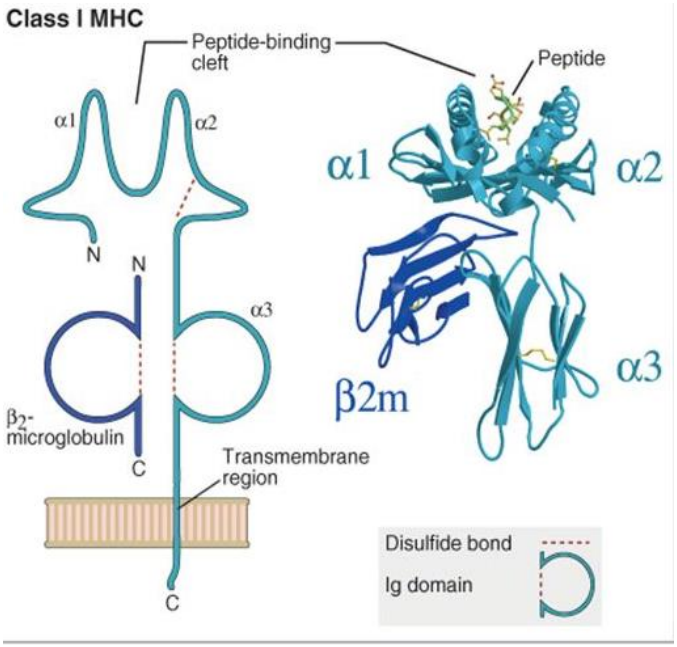


Fig.2 Molécula de HLA-I, tomado de Inmunología celular y Molecular, Abul K. Abbas, (2015).

La cadena pesada de las moléculas de HLA-I es un complejo trimolecular conformado por una cadena pesada polimórfica que posee 3 dominios α: α1, α2, y α3 y una cola citoplasmática que la ancla a la membrana celular(fig. 2). Posee una región polimórfica de unión al péptido entre los dominios α1 y α2 (Abbas, 2015), y está codificada por los genes del complejo Mayor de Histocompatibilidad localizados en la región 21.3 del brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) (fig. 3), mientras que la cadena liviana *β*-microglobulina (*β_2m)* está codificada por un gen localizado en la región génica 21 del brazo largo del cromosoma 15 (15q21). La cadena α es una de las zonas más polimórficas del genoma humano mientras la *β_2m* no es polimórfica y se expresa en todas las células nucleadas unida de manera no covalente con la cadena pesada α. En el sitio de unión al péptido se carga el péptido endógeno de 9 a 11 aminoácidos que será presentado a los CTLs (Klein, J., Sato A, 2000).

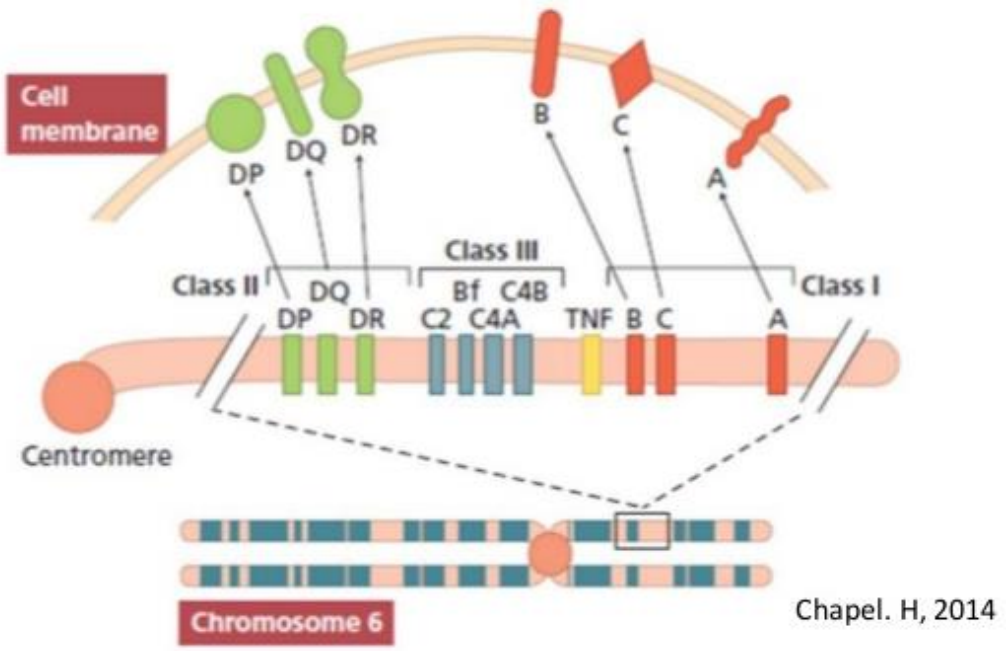


Fig.3 genes codificadores de las moléculas de HLA, está situada en la región del CMH, cromosoma 6.

6.3 Terapia génica

Los avances en ingeniería molecular han permitido el que una dotación de genes de una célula pueda ser alterado por medio de la inserción de un gen codificador normal en un organismo, que hará sustituir el gen que en su expresión es defectuoso, esto es lo que llamamos terapia génica. Entonces la definimos como una suma de herramientas que nos van a permitir el uso de vehículos moleculares para transportar DNA o RNA al interior de las células, esto se hace con el fin de modificar la expresión de proteínas que presenten alteraciones, con esto se revierte el problema biológico que produce (Novelli & Gruenert, 2002).

Las terapias génicas se pueden administrar *in vivo* y *ex vivo,* en la primera etapa, el tratamiento consiste en la administración de una construcción genética en la cual tenemos un interés

particular. Aunque el DNA se puede administrar de forma directa, se usan vectores que facilitan el proceso de transferir el gen e igualmente una entrada y localización intracelular del mismo, para obtener un gen funcional (Rodríguez *et al.*, 2014). Es importante usar vectores con destinos específicos dependiendo cuál sea el daño, dentro del organismo para permitir la entrega celular selectiva del gen en un determinado órgano o tejido, sin requerir procedimientos quirúrgicos. En el segundo caso se incluye la obtención previa de células de un tejido u órgano, después, se hace la separación de las células y se cultivan en tejidos *in vitro*, seguidamente, las células son transfectadas por el gen terapéutico utilizando un vector. Las células transfectadas se seleccionan en función de su capacidad para expresar el gen exógeno de forma estable y persistente. Las células seleccionadas se amplifican, se recolectan y se reimplantan en el paciente (Lastra, 2006).

Uno de los mayores retos que presenta la transferencia génica, principalmente para la terapia *in vivo* del cáncer es que los focos tumorales ocultos a veces no son accesibles a la terapia, por lo cual su éxito depende de la capacidad que tiene el vector para proteger y transferir eficazmente el gen terapéutico, en el lugar específico, el gen terapéutico. La transfección de las células se puede realizar por métodos no virales como el bombardeo de partículas, la inyección directa de DNA y los liposomas catiónicos, entre otros (Rodríguez *et al.*, 2014) o por métodos virales, es decir, con el uso de un vector viral que porte el gen terapéutico y tenga la capacidad de infectar las células tumorales para expresar el transgén. Los vectores virales en general están desprovistos de algunos genes para dejar el espacio donde se va a insertar el gen terapéutico y conservan las secuencias de empaquetamiento de la partícula viral y el sitio de inserción en el genoma de la célula Diana (Chinén, 2000). Entre los vectores virales más utilizados tenemos los Adenovirus, los retrovirus, los virus Adenoasociados, los herpes virus, los alfavirus y los poxvirus entre otros. (Rodríguez *et al.*, 2005).

6.4 Agentes virales para la terapia génica

Retrovirus: son muy efectivos para la transferencia génica estable por largos periodos de tiempo en células difíciles de transducir cómo las hematopoyéticas, o las de cultivo primario (Lastra, 2006). Sin embargo, una desventaja está en que sólo infectan células en replicación activa (Chinén, 2000; Lastra, 2008), por lo tanto, no son útiles en células que rara vez se dividen como neuronas o músculo esqueléticas. Otra de las desventajas que presentan los vectores retrovirales es el carácter azaroso de inserción en el genoma de la célula diana, que puede generar genotoxicidad, activar oncogenes, interferir con la muerte celular o reparación del DNA, favoreciendo los efectos mutagénicos(Chinea, 2018).

Virus Adenoasociados (VAA): han sido estudiados para la terapia génica, porque se pueden integrar en el genoma de la célula diana y son poco inmunogénicos. La expresión del transgén es estable a largo plazo en células que no se dividen y atraviesan la barrera hematoencefálica por lo que pueden utilizarse para administrar terapias génicas en células del sistema nervioso cómo las neuronas. Sus desventajas consisten en que, para poder replicarse, requieren de la coinfección con un adenovirus, por lo cual es difícil producirlos en masa y que, debido a su pequeño tamaño, no pueden albergar un gen terapéutico de gran tamaño (Nasso, 2017).

Virus Herpes Simplex: tiene tropismo por las células del sistema nervioso, por lo cual se ha utilizado como vehículo para la administración de terapia génica en las células neuronales, con la ventaja de que no se integra en el genoma de la célula diana, pero puede permanecer como episoma hasta la muerte de la neurona permitiendo la expresión del transgén durante toda la vida de la célula infectada. Sin embargo, una de sus mayores desventajas es el alto grado de

inmunogenicidad, es decir que fácilmente puede ser detectado por el sistema inmunológico (Rodríguez, 2014).

Adenovirus: es el vector viral más utilizado hasta ahora para la terapia génica, tiene ventajas como su alta tasa de replicación, el tamaño de su genoma (Aprox. 35 kb) que le permite albergar un gen terapéutico de gran tamaño, su capacidad de infectar células cualquier etapa de su ciclo celular y su fácil producción y titulación en el laboratorio (Navarro, Borunda y Montes 2015). Son de un genoma grande y de organización más complejas que otros vectores víricos usados en la terapia génica, además que se utilizan también para la inmunización contra otros vectores patógenos (Andrews *et al.,* 2001). Pese a que su aplicación en ocasiones puede generar efectos secundarios, por lo general estos no revisten gravedad, además, la mayor desventaja es su amplio tropismo celular que se refleja en una baja especificidad celular, lo que complica la infección en células específicas de procedimientos *in vivo,* sumado a que su administración produce una respuesta inmunológica que perjudica la eficiencia de la traducción, la eliminación de células translúcidas y la expresión del gen (Navarro *et al*., 2015).

6.5 Inmunoterapia en el cáncer

La inmunoterapia es un tratamiento que se basa en la inhibición o activación del sistema inmunológico, para que sea capaz de combatir las infecciones, el cáncer y otras enfermedades. En el tratamiento del cáncer, la inmunoterapia estimula el sistema inmunológico del paciente para generar una respuesta antitumoral. Ante la presencia de un tumor, el sistema inmunológico será capaz de realizar un reconocimiento específico de antígenos o células tumorales, de forma que tras un primer contacto se produce una hipersensibilidad. Posteriormente, el sistema

inmunológico producirá células T CD8+ para la molécula extraña, de manera que cuando sea identificada nuevamente, sea capaz de atacar y eliminarla. Además, las células inmunitarias cuentan con correceptores de superficie que regulan la actividad del sistema inmunológico y mantienen el equilibrio para conseguir una respuesta adecuada. Por tanto, la interacción del sistema inmunológico con las células cancerosas la podemos diferenciar en dos procesos: activación y muerte de células T (Marín *et al.*, 2018).

Contrario a las demás terapias contra el cáncer, la inmunoterapia no va dirigida contra las células tumorales, sino que su blanco es el sistema inmunológico. Puede definirse como un entrenamiento al sistema inmunológico para que pueda combatir la enfermedad (Graeber, 2018).

6.6 Terapia génica en el tratamiento del cáncer

La terapia génica es procedimiento destinado a reemplazar, manipular o complementar genes no funcionales o que funcionan mal con genes sanos. Los genes son secuencias específicas de bases que codifican instrucciones sobre cómo producir proteínas. En 2001, se publicaron dos versiones preliminares independientes de la secuencia del genoma humano y la identificación concomitante de aproximadamente 30.000 genes (Lander *et al*., 2001).

Como era de esperar, esto fue seguido por una extensa investigación en genética molecular con herramientas avanzadas utilizadas para diseccionar la función de los genes y explorar los procesos biológicos involucrados en causar aberraciones genéticas y transformación maligna (Amer, 2014) Aunque los genes reciben mucha atención, son las proteínas las que realizan la mayoría de las funciones vitales e incluso constituyen la mayoría de las estructuras celulares.

Cuando los genes se alteran de modo que las proteínas codificadas no puedan realizar sus funciones normales, pueden producirse trastornos genéticos como el cáncer. La reciente proliferación de conocimientos sobre el cáncer ha llevado al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos en el tratamiento del cáncer, en particular la terapia génica. (Patil *et al.*, 2018).

El tratamiento del cáncer se ha enfocado en la destrucción de las células tumorales por mecanismos cómo la cirugía, radioterapia o quimioterapia y en la actualidad se cuenta con una serie de terapias dirigidas que interfieren con el ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis, y otras vías de señalización. La terapia génica, surge como una alternativa promisoria y menos tóxica para el tratamiento del cáncer que ha demostrado ser efectiva para la disminución del tamaño de los tumores. (Cross & Burmester, 2006).

Los vehículos más usados para la transferencia de genes en ensayos clínicos son los adenovirus, los plásmidos desnudos y retrovirus. Aproximadamente del 60% al 70% de ensayos clínicos con terapias génicas están enfocados al cáncer. (Morales, 2018). La producción de fármacos para la lucha contra el cáncer humano, se ha enfocado en la interceptación de vías de señalización que promueven el crecimiento del tumor. Sin embargo, como ocurre con otros medicamentos, este enfoque conduce a que se genere resistencia al tratamiento por el desarrollo de tolerancia frente al fármaco. Enfocarse en el genoma cómo diana terapéutica podría tener ventajas sobre la radioterapia y la quimioterapia, debido a que se podrían diseñar terapias específicas para las alteraciones génicas de un tumor particular y destruir las células cancerosas independientemente de si las mutaciones son cancerígenas (Chen, Gao & Huang, 2015).

Según (Rodríguez *et al*., 2014) y (Annan *et al*., 2017) La elección de la terapia génica para el cáncer depende de los fundamentos que utilice para lograr la eliminación de células tumorales:

1. La terapia por compensación de mutaciones para la corrección de genes supresores de tumor o inhibición de oncogenes activados
2. La terapia génica suicida o quimioterapia molecular, que consiste en la infección del tumor con un virus de replicación selectiva que codifique una enzima capaz de activar un profármaco en el tumor.
3. La terapia oncolítica, en la cual se infectan las células tumorales con un virus lítico).
4. La Inmunopotenciación genética que busca incrementar la inmunogenicidad del tumor o potenciar la actividad antitumoral de las células del sistema inmune.
5. La terapia anti angiogénesis para inhibir la proliferación de células tumorales.

6.7 El cáncer y la vigilancia inmunológica

Una de las capacidades que tiene el sistema inmunológico es la vigilancia frente al crecimiento de neoplasias. A mediados del siglo XX Thomas y Burnet, propusieron la teoría de la vigilancia inmunológica que postula, que dentro de un organismo siempre se están produciendo células malignas, que son identificadas y eliminadas por el sistema inmunológico antes de que se conviertan en cáncer (Acebes, 2015). también demostrando la vulnerabilidad de los hospederos con sistemas inmunológicos deficientes para desarrollar tumores. (Velazco, López & Quintana, 2017) como se evidenció en los experimentos realizados en ratones singénicos, en la década del 40, mostraron que tumores que se inducían químicamente para luego ser retirados generaban una resistencia contra el mismo tumor. Esta respuesta estaba principalmente mediada por linfocitos,

ya que cuando eran trasplantados desde un animal con esa respuesta inmunológica a uno no inmunizado, le conferían la inmunidad. (Prehn & Main, 1957).

Estos hallazgos despertaron el interés por el concepto de vigilancia inmunológica en relación con el cáncer. En las últimas décadas, se ha confirmado y refinado la hipótesis de la vigilancia inmunológica y el gran potencial que posee el sistema inmunológico para evitar el crecimiento tumoral es el fundamento de la inmunoterapia oncológica (Velazco, López & Quintana, 2017), por lo cual se puede definir la inmunovigilancia como la habilidad que tiene el sistema inmunológico para detectar y eliminar células durante las carcinogénesis. Lo anterior se ha evidenciado en estudios provenientes con modelos animales inmunodeficientes y en pacientes con problemas del sistema inmunológico (Veseley, Kershaw, Schreiber & Smyth, 2011).

La afirmación anterior de la inmunovigilancia, implica que en ausencia del sistema inmunológico el problema de tumores hubiese sido exponencialmente mayor. Existen evidencias que implican al sistema inmunológico en cierta protección contra algunos tumores, principalmente los que se encuentran asociados a infecciones virales. Por ejemplo, se ha observado un aumento en la incidencia de ciertos tipos de tumores en pacientes trasplantados e inmunosuprimidos y en aquellos con tumores del sistema linforreticular, como el linfoma asociado al virus Epstein-Barr (EBV), y en el sarcoma de Kaposi, frecuente en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. De igual forma, los avances en el entendimiento celular y molecular de los procesos de presentación y reconocimiento de antígenos asociados a las moléculas HLA y la manipulación clínica del sistema inmunológico en la lucha contra el cáncer, le ha dado gran relevancia al concepto de escape de la inmunovigilancia antitumoral, en relación con la inmunoterapia antitumoral (Salazar, 2000).

No hay duda, que la actividad antitumoral más relevante, está dada por la respuesta celular. A pesar de haber ejemplos de antígenos de superficie reconocidos por anticuerpos, van a tener más importancia en detección y tipificación de tumores más que en el aspecto terapéutico. Durante las últimas décadas, se ha experimentado un enorme avance en lo que relaciona la comprensión de cómo funciona el sistema inmunológico, principalmente con relación al reconocimiento antigénico. Todo este conocimiento acumulado, sumado al gran impulso de técnicas en biología molecular que facilita la clonación génica y producción de proteínas recombinantes, permiten la identificación de nuevos antígenos asociados a tumores y su caracterización. (de Leon & Pareja, 2018).

7. METODOLOGÍA

7.1 Determinar las condiciones óptimas del cultivo celular para las células ad293

Inicialmente se prepararon cajas de cultivo de 25 cm^2 estériles con medio de cultivo DMEM suplementado con SFB 10% y antibióticos (ampicilina y estreptomicina) 1%, seguido a esto fueron retirados los crioviales que contienen las células ad 293 del contenedor con nitrógeno líquido donde, de forma directa, se pipetearon los viales con medio de cultivo DMEM hasta el descongelamiento total de las células por medio de pipeteo continuo. El contenido del vial se vertió en las cajas de con medio DMEM completo y se incubaron a 37°C con CO_2 al 5%.

La otra metodología que se ensayó consistió en incubar los crioviales a 37°C inmediatamente después de retirarlos del nitrógeno líquido. Para evitar una posible contaminación se mantuvieron verticales con pinzas hasta su descongelamiento total, de forma rápida puesto que esto previene la formación de cristales en el momento en que la temperatura baja de -50ºC a 0ºC, si el proceso se lleva a cabo lentamente causa daño celular, ya que se forman cristales que romperán la membrana. Los crioviales fueron limpiados con pañitos embebidos en isopropanol y se procedió a mezclar el contenido del criovial con medio de cultivo DMEM por medio de pipeteo y se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml con 4 ml de medio de cultivo. Se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio de cultivo fresco, se vertió en las cajas de cultivo con medio DMEM y se incubaron a 37°C con CO_2 al 5%.

Se revisaron las cajas diariamente, para monitorear su crecimiento, haciendo cambios de medio cada 3 o 4 días dependiendo del grado de metabolización del medio de cultivo. Cuando las células alcanzaron su confluencia para lograr separarlas y abrir en nuevas cajas de cultivo la

forma más conveniente de hacerlo y que formen una suspensión celular, para manejarlas fácilmente, es mediante el uso de enzimas como por ejemplo la tripsina, es una proteasa que digiere las proteínas celulares implicadas en la adhesión celular. Se aspiró el medio de cultivo del frasco que fue previamente obtenido de una incubadora de CO_2 para luego lavarse con 5 ml de PBS 1X (Phosphate-buffered saline), ya que contribuye a la debilitar la adherencia que presentan las células al frasco de cultivo celular, con el fin de eliminar el inhibidor de tripsina. Seguido se incorporó en el frasco de cultivo 2 ml de tripsina, se movió horizontalmente por ~1 minuto, con el fin de que toda la superficie fuera cubierta, se aspiró está tripsina y se dejó un pequeño volumen en el frasco de cultivo, para luego ser llevado a una incubadora a 37°C durante 2 minutos, seguidamente, después de ser retiradas de la incubadora se verificó que las células despegaron y al verse algunas agrupaciones aún adheridas, se les dio unos pequeños topecitos con el fin de retirarlas totalmente. Luego se diluyó en el frasco de cultivo 5 ml de DMEM con el fin de inhibir el efecto de la tripsina, se pipeteó para terminar de levantar las células y además evitar aglomeraciones, luego en un tubo Falcon de 15 ml se llevó el medio con las células y se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm con el fin de retirar restos de tripsina en el medio, se descartó el medio y se resuspendió con 8 ml de medio de cultivo varias veces con el fin de evitar aglomeraciones, se llevó a una caja de cultivo de 75 cm^2, se marcó apropiadamente con fecha del día en que se realizó y número de pase de las células. Se llevó a la incubadora a 37°C con CO_2 al 5% y se revisó periódicamente la metabolización del medio para hacerle los respectivos cambios de medio.

7.2 *Construcción los esqueletos adenovirales recombinantes para los genes que codifican HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02*

7.2.1 Amplificación, secuenciación y clonación de los genes que codifican HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02

A. Amplificación de los genes que codifican para HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02:

a. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): la PCR es una técnica utilizada en el laboratorio para amplificar un fragmento específico de DNA. Utiliza unas secuencias cortas de entre 15 y 30 nucleótidos llamadas cebadores que son complementarias a regiones específicas del genoma para seleccionar la parte que se va a amplificar. Incluye una variación secuencial en la temperatura que alcanza la muestra durante la reacción. Con esta técnica se pueden producir millones de copias de la secuencia diana en pocas horas. La tabla 1 resume las condiciones de PCR para amplificar los genes que serán clonados.

Tabla 1. Reactivos utilizados para realizar la PCR convencional.

Reactivo	**Concentración en µl**
H_2O, agua libre de DNAsas	16.05
Buffer 10X	2.5
$MgCl_2$ (25uM)	0.75
DNTP's (10uM)	2.5
Cebador directo (10uM)	0.5
Cebador reverso (10uM)	0.5
DNA taq polimerasa (5U/ul)	0.2
DNA Plasmídico (pLNCX) (0.2ng)	2

Tab. 2 perfil térmico de la PCR convencional

Parámetro	**Perfil térmico**				
	Denaturación inicial	**40 ciclos**			**Extensión final**
		Denaturación	**Hibridación**	**Extensión**	
Temperatura	95°C	95°C	65°C	72°C	72°C
Tiempo	5 min	30 seg	30 seg	1 min	7 min

Los genes contenidos en el plásmido pLNCX-HLA-A*02:01 y pLNCX-HLA-B*44:02, gentilmente donados por el grupo de inmuno patología Tumoral del hospital Virgen de la Nieves en Granada España, fueron amplificados mediante PCR convencional (Sambrook & Russell, 2001). Los cebadores utilizados fueron diseñados adicionando los sitios de corte de las enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII* contenidos en el sitio de multiclonaje del plásmido auxiliar (pShuttle) para su posterior clonación en este vector.

Tab. 3 cebadores usados para amplificar los genes de HLA

Cebador	**Secuencia**	**Temperatura de hibridación**
HLA-A*0201XhoI	5’-ATACTCGACATGGCCGTCATGGCGCC-3’	65°C
HLA-A*0201HindIII Rev.	5’-ACGAAGCTTTCACACTTTACAAGCTGT-3’	65°C
HLA-B*4401XhoI	5’-ATACTCGAGATGCGGGTCACGGCGCC-3’	65°C
HLA-B*4401HindIII Rev.	5’-ACGAAGCTTTCAAGCTGTGAGAGACA-3’	65°C

.

B. Electroforesis en gel de agarosa:

Una vez amplificados los genes, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para verificar que el tamaño de los amplímeros correspondiera al tamaño esperado. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 0,8%, el corrido se realizó a 100 voltios durante 60 minutos y se verificó el resultado en el analizador de imágenes Biorad Gel Doc XR System w/ Universal Hood II de la casa BIO-RAD (Estados Unidos), utilizando el software Image Lab de BIO-RAD.

C. Purificación de amplímeros HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02 a partir de banda de gel de agarosa con el kit Cytiva (Formerly GE Healthcare Life Sciences) illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification

Se unieron los productos de PCR donde estaban nuestros genes de interés, HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02. Con el fin de conseguir la mayor cantidad de producto, se hicieron varias PCR, después de verificar el amplificado en las diferentes reacciones por electroforesis en gel de agarosa, se unieron los amplímeros de cada uno de los genes en dos tubos de PCR, completando 100 µl de cada uno. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa para purificar el producto de PCR. Se unieron 5 dientes del peine de la cámara de electroforesis con cinta de enmascarar para realizar un pozo grande en el que cupieran los 100 µl de cada PCR. Se corrió la electroforesis durante ~40 minutos a 150 v, para obtener la banda del amplímero y poderla purificar a partir del gel.

Después, con un escalpelo estéril, se realizaron cortes sobre el gel alrededor de las dos bandas, tratando de dejar la menor cantidad de agarosa posible para facilitar el proceso de purificación del producto de PCR. La banda así obtenida se colocó en un tubo eppendorf de 1.5ml previamente pesado. Se adicionó el buffer de captura #3 en proporciones iguales a sus masas mg/µl, a la banda de HLA-A*02:01 se le adicionaron 294µl del buffer porque su peso fue de 294 mg y a la de HLA-B*44:02 se le adicionaron 455µl. Se mezclaron por inversión cada tubo y se incubaron a ~65°C en plancha de calentamiento hasta que se licuó la agarosa. Posteriormente en los tubos de recogida se introdujeron columnas GFX™, en ellas se adicionó el producto de la incubación en plancha de calentamiento s se centrifugó a 16.000 g por 1 minuto, Se repitió este procedimiento en ambas muestras porque el volumen final de la mezcla de agarosa, DNA y Buffer fue mayor a 800µl. A continuación, a cada tubo se le adicionaron 500 µl de buffer de lavado tipo 1 y se centrifugaron a 16000 g durante 30 segundos. Se descartó el contenido del tubo de recogida y las columnas se colocaron en un tubo eppendorf. Se adicionaron 40 µl del buffer de elución tipo 4 en cada columna y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugaron las columnas colocadas en el tubo eppendorf a 16000 g por 1 minuto, para obtener 40 µl del DNA purificado listo para la secuenciación.

7.2.2 Secuenciación Sanger de los genes amplificados:

La secuenciación que permite determinar la secuencia de nucleótidos para identificar variantes de secuencia se denomina secuenciación sanger y se caracteriza porque es analizada mediante electroforesis capilar. Se parte de la extracción del DNA o RNA que debe ser amplificada por PCR o por RT-PCR respectivamente. El producto de PCR se debe purificar para eliminar principalmente dos contaminantes que puedan interferir con el análisis: los cebadores, que

pueden interferir con los que se usan en la reacción de secuencia, porque para la secuencia, se deben realizar dos reacciones por separado, una con el cebador directo y la otra con el cebador reverso, porque, aunque las secuencias del DNA son complementarias, estrictamente hablando son dos secuencias diferentes. El otro contaminante que se debe eliminar son los DNTPs porque es necesario mantener la concentración de DNTPs que vienen en la reacción de secuenciación.

Con este método de secuenciación se lleva a cabo en el mismo proceso y de una forma simultánea, cuatro mezclas de reacción para cada uno de los nucleótidos. En cada mezcla se utiliza la DNA polimerasa para sintetizar la hebra complementaria a una secuencia concreta perteneciente a una molécula de DNA de hebra sencilla. El cebador para la síntesis es un fragmento de DNA sintetizado por métodos químicos complementario a una parte de la secuencia, en este caso de HLA-A y HLA-B. Cada mezcla de reacción contiene, además de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatos (marcados con fluorocromo), una pequeña concentración del análogo 2',3'-didesoxi de uno de los nucleótidos, uno diferente para cada mezcla de la reacción.

En la figura 4 podemos observar cómo por direccionalidad, en la orientación 3’, el carbono número 3 que está conformado por un grupo hidroxilo, se va a unir al grupo fosfato de un siguiente nucleótido, pero al ser retirado el oxígeno del carbono número 3 del azúcar pentosa del nucleótido, no va a permitir que se una el grupo fosfato del siguiente nucleótido, haciendo que la síntesis de esa cadena de DNA se detenga en esa posición.

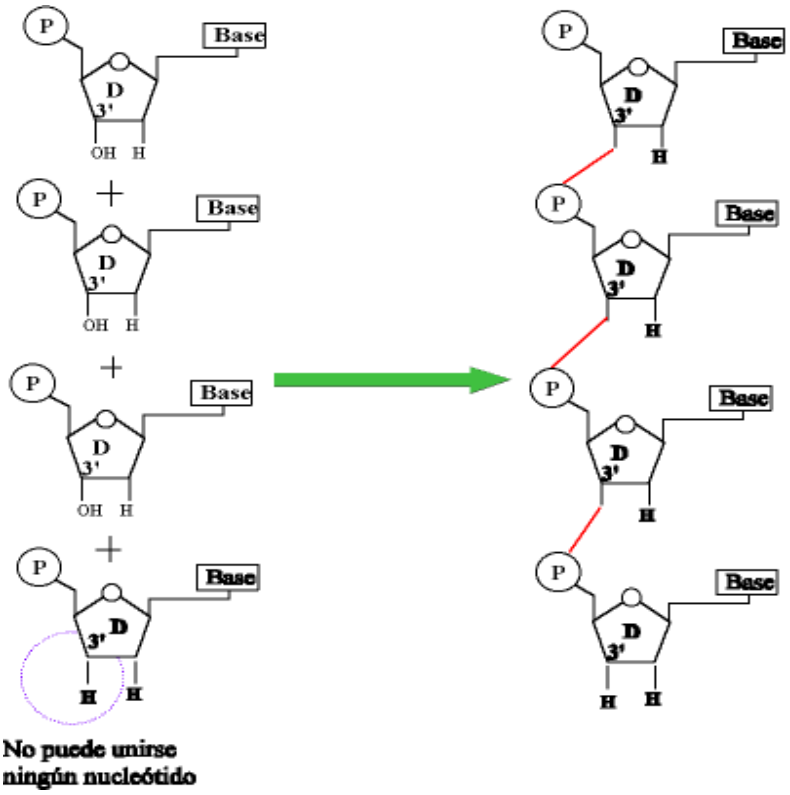


Fig. 4 nucleótido en una secuencia de lectura, se puede observar en la imagen de la izquierda como al perder el oxígeno del grupo hidroxilo, no se puede adherir el grupo fosfato del siguiente nucleótido.

Después de realizada la purificación con el kit Cytiva (Formerly GE Healthcare Life Sciences) illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, con los productos de la purificación, se llevó a cabo la reacción de secuencia con el kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing, que contiene todos los reactivos necesarios para generar la secuencia, en donde se lleva a cabo una reacción única de secuencia que se realiza en presencia de cuatro ddNTPs, los cuales están marcados cada uno con una sonda fluorescente distinta. Finalizada la reacción se realizó una purificación con el kit BigDye XTerminator™ Purification Kit, que es un método de purificación rápido y simple para reacciones de secuenciación de DNA. Elimina las sales y los terminadores BigDye® no incorporados. Se centrifugó el tubo de reacción, luego se pipeteó el volumen necesario de solución SAM™ en cada una de las muestras, que aumenta la eficiencia de

XTerminator™ además de estabilizar reacciones posteriores a la purificación; luego se le adicionó la solución XTerminator™ en cada tubo, que permite la limpieza de sales libres y fluorocromos no incorporados posteriores a la reacción, se agitó y con una pipeta de calibre ancho, se pipeteó la muestra en cada pocillo de la placa, posteriormente se selló la placa con un sellador térmico, se agitó en vórtex durante 30 minutos, se centrifugó y finalmente se montó en el equipo 3500 Genetic Analyzer for Resequencing & Fragment Analysis™.

Terminado esto, las mezclas se corrieron en una electroforesis dejando correr cada una de las cuatro reacciones sobre una línea individualmente, como en su fundamento, las cadenas migran dependiendo de su tamaño, en la secuenciación dependiendo de si la síntesis fue bloqueada antes por la adición de un didesoxinucleótido o si su síntesis finalizó posteriormente, migrarán una menor o mayor longitud, respectivamente. El resultado muestra un patrón de bandas, donde ninguna, en las cuatro líneas, tendrá la misma altura. La posición de estas bandas permite observar qué nucleótido se presenta después de otro. Si la primera banda, fue donde ocurrió la mezcla con didesoxiadenina, es porque el primer nucleótido es una adenina; si la siguiente banda fue donde ocurrió la mezcla con didesoxitimina, es porque el siguiente nucleótido, es una timina y así sucesivamente (França, Carrilho & Kist, 2002).

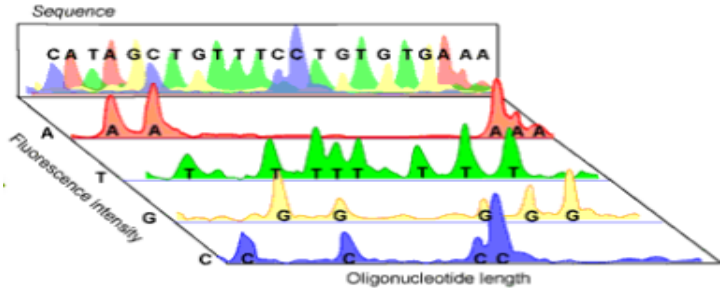


Fig. 5 disposición de la lectura de los nucleótidos en un electroferograma.

Para el análisis de las secuencias se utilizaron dos softwares: SnapGene® Viewer 5.1.3.1., con el que se obtiene un electroferograma que permite determinar la secuencia de nucleótidos, y

posteriormente mediante el software CLC Sequence Viewer® se realizó el alineamiento de la secuencia consenso con la del producto de PCR purificado para confirmar la identidad de los genes amplificados. Es importante utilizar una taq DNA polimerasa de alta fidelidad para amplificar genes que serán clonados.

Tab. 4. volúmenes estándar de los reactivos para la mezcla de la reacción para la secuenciación

Componentes	**Reacción estándar**		
	Concentración por reacción	**Directo**	**Reverso**
BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	4µl	4µl	4µl
Primer directo (3.2 µM)	3.2 pmol	1µl	___
Primer reverso (3.2 µM)			1µl
Agua desionizada libre de DNAsas y RNAsas.	Depende del volumen amplímero/ cebadores.	4µl	4µl
Amplímero: (*150-300 ng /µl of dsDNA)*	*150-300 ng /µl of dsDNA*	1µl	1µl
Volumen total	10µl	10µl	10µl

Tab.5 Perfil térmico de la PCR para secuenciación:

Parámetros	**Pasos**				
	Iniciación	**25 ciclos**			**Mantener**
		Desnaturalización	**Hibridación**	**Elongación**	
Temperatura	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Tiempo(mm: ss)	01:00	00:10	00:05	04:00	Holding

7.2.3 Clonación de los genes HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02 en el vector pShuttle-CMV

El primer paso para la construcción del adenovirus recombinante es clonar los genes de interés en el sitio de multiclonaje del pShuttle elegido utilizando las enzimas de restricción para los sitios que se añadieron en los iniciadores utilizados para amplificar los genes de interés. En este caso se utilizó el pShuttle-CMV que contiene un único sitio de multiclonaje localizado entre el promotor del citomegalovirus (CMV) y la señal de poliadenilación del virus SV40, lo que le permite la inserción de un casete de expresión completo incluyendo los promotores especializados y las señales de terminación (hasta 7,5 kb). También contiene unas regiones de homología de secuencia con el plásmido pAdEasy-1 para que se produzca la recombinación homóloga, y unas regiones de repeticiones terminales invertidas cortas (izquierda y derecha) R-ITR y L-ITR flanqueando el cassette de expresión que contienen el origen de replicación y deben estar en cis, con respecto al transgén, para el empaquetamiento y producción de las partículas virales y la posterior expresión del gen de interés en la superficie de las células diana.

A. Digestión enzimática:

Como se mencionó anteriormente, los cebadores que se utilizaron para amplificar los genes de interés contenían en su secuencia el sitio de corte para las enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII* contenidos en el sitio de multiclonaje del plásmido pShuttle-CMV. Una vez amplificados los genes HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02 a partir del plásmido pLNCX y verificada la identidad del amplímero, se realizó la digestión enzimática de los productos de la PCR y del plásmido auxiliar pShuttle-CMV que contiene el promotor del Citomegalovirus, el cual es un promotor fuerte para la expresión génica. Las enzimas, endonucleasas de restricción, cortan el DNA de cadena doble generando extremos romos y/o cohesivos. Las que generan extremos cohesivos reconocen una secuencia de 4 a 12 pares de bases con organización palindrómica (se lee igual en ambos sentidos), y cortan el DNA generando estos extremos que tienen más tendencia a unirse espontáneamente debido al apareamiento de las secuencias en los extremos del DNA (Producto de PCR y plásmido) digeridos por la enzima. En el presente estudio la digestión enzimática se llevó a cabo con las enzimas de restricción HindIII y XhoI (New England BioLabs Inc.), por 90 minutos a 37°C. Posteriormente se inactivaron las enzimas a 65°C durante 15 minutos. La figura 4 nos muestra el mecanismo de acción de la enzima EcoRI, como ejemplo de un corte cohesivo.

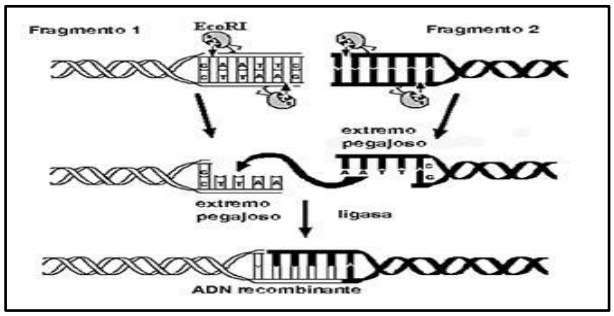


Fig. 6 Acción de la enzima de restricción EcorI.

Tab. 6: Extremos cohesivos generados por la digestión con las enzimas HindIII y XhoI.

Enzima de restricción	**Sitio de corte**
HindIII	5'-A|AGCTT-3' 3'-TTCGA|A-5'
XhoI	5'-C|TCGAG-3 3'-GAGCT|C-5''

Tab. 7 cantidad de reactivos para la digestión enzimática del plásmido pShuttle y los genes de interés

DNA	**pShuttle-CMV**			**HLA-B*44:02**
Reactivo	**Tubo 1**	**Tubo 2**	**Tubo 3**	**Tubo 4**
Buffer M 10X	2,5µl	2,5µl	10µl tubo 1 + 10µl tubo 2	2,0µl
Xho I	1,0µl	-		1,0µl
Hind III	-	1,0µl		1,0µl
DNA	3,0µl	3,0µl		10,0µl (0,82µg)
Agua	18,5µl	18,5µl		6,0µl
Volumen total	**25,0µl**	**25,0µl**	**20,0µl**	**20,0µl**

B. Purificación de la digestión del plásmido pShuttle-CMV y los productos de PCR HLA-B*44:02

Una vez finalizada la digestión enzimática e inactivada la enzima, se purificó el producto de la digestión con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para retirar reactivos utilizados en la digestión,

siguiendo el protocolo estándar: brevemente, se realizó la extracción de proteínas adicionando un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 8.000 g por 10 min a 4 °C. Se extrajo la fase acuosa y el DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,3; durante 30 min a -20 °C. Se centrifugó a 10.000 g por 20 min, se descartó el sobrenadante y el DNA purificado se lavó con etanol al 70 %, se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y el pellet de DNA se secó a temperatura ambiente. Una vez seco, se resuspendió en 50 µL de buffer TE.

C. Reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa para generar el cassette de expresión

Se comprobó la correcta digestión del pShuttle-CMV mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y finalmente se realizó la ligación de los plásmidos pShuttle-CMV-HLA-B*44:02 con 1,0µl de la enzima T4 DNA ligasa que cataliza la unión de dos hebras de DNA cohesivas o de extremos romos entre los grupos 5´-fosfato y 3´-hidroxilo de nucleótidos adyacentes. Esta enzima no se une a ácidos nucleicos monocatenarios. Toda la noche a 16°C, para ligar el gen inserto en el vector de clonación.

Tab. 8 concentraciones de reactivos usados para la ligación de los productos de la digestión.

Reactivo	**Inserto**	
	HLA-B*44:02	**Sin inserto**
Plásmido	2,0µl	2,0µl
Inserto	4,0µl	-
Buffer ligasa 10X	1,0µl	1,0µl
Ligasa	1,0µl	1,0µl
H_2O	2,0µl	6,0µl
Volumen total	10,0µl	10,0µl

7.2.4 Transformación de las bacterias DH5α

Para la amplificación de los plásmidos recombinantes que tenían el inserto vectores se transformaron células de *E. coli DH5α* con los productos de ligación obtenidos. Se tomaron 100µl de células en un tubo de 1,5mL y se adicionan 100 ng de cada producto de ligación. Se conservó en hielo por 30 minutos y luego se hizo un choque térmico a 40°C por 90 segundos y luego a 4°C por 10 minutos. En seguida se adicionaron 900µl de medio LB precalentado a 37°C a las células transformadas y se dejaron en incubación a 37°C por una hora. Posteriormente las células se sembraron en cajas de petri con agar-LB-kanamicina. En cada caja se sembraron diferentes volúmenes del producto de la transformación de las células *DH5α* con el plásmido pShuttle (50, 100 y 850µl) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente se observó el crecimiento de colonias blancas en el agar. Se seleccionaron ocho colonias de las más pequeñas para verificar cuáles colonias bacterianas eran recombinantes y poseían el gen de interés. Las colonias seleccionadas se picaron y se dejaron crecer en 2ml de medio de cultivo LB-kan a 37°C durante toda la noche con 2.500 rpm. Al siguiente día, en un tubo eppendorf de 1.5ml se introdujo 1.5ml de bacterias, se colectaron por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C, por pipeteo se descartó el medio y se repitió el proceso una vez más. Posteriormente se le adicionó 100 µl de la solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0) y EDTA 10 mM (pH 8,0)) y se procedió a darle vórtex hasta que se homogeneizó la muestra, seguido se preparó la solución II (NaOH 0,2N y SDS 1%), se mezcló por inversión, después de observar que la mezcla se puso ligeramente transparente y viscosa, se le adicionó 4 µl u se incubó durante una hora a 37°C. Posteriormente se le adicionó la solución III (acetato de sodio 3M pH 5,2), se mezcló nuevamente por inversión y se llevó a hielo. Después de estar 10 minutos en el hielo se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se llevó a otro

eppendorf con 450 µl de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló por inversión, para luego llevarse durante 30 minutos a -20°C, luego se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70%, se llevó a centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm y se removió el etanol, se dejó secar el pellet hasta quedar transparente y finalmente se resuspendió en 30 µl de buffer TE y 1 µl de RNAsa.

Se tomó 1µl de cada purificación para confirmar la identidad del inserto en cada plásmido por PCR convencional con los cebadores que anillan en sectores del plásmido que flanquean el sitio de multiclonaje de tal modo que si se insertó correctamente el gen el amplificado será de aprox. 1500 pb correspondientes al tamaño del gen más un segmento adicional del vector. Con los productos de PCR se hace una electroforesis de agarosa al 1% para verificar el tamaño de los insertos. Los plásmidos que presentaron el amplificado esperado se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% para observar pureza y se seleccionó uno de cada gen para continuar con el siguiente paso.

7.2.5 Transformación de las líneas celulares BJ5183

La recombinación homóloga entre el pShuttle-CMV-HLA-B*44:02 y esqueleto adenoviral pAdeasy-1 que carece del gen E1 y E5, se llevó a cabo por recombinación homóloga en la línea celular BJ5183 que presenta una alta frecuencia de recombinación debido a que presenta el gen *recA*. Tanto el vector de transferencia, como el esqueleto adenoviral, poseen unos brazos de homología, donde dará lugar a la recombinación. El plásmido pShuttle-CMV-HLA-B*44:02 fue linealizado con la enzima de restricción *pmeI* posteriormente se desfosforilaron con fosfatasas, se

purificaron los productos linealizados con fenol-cloroformo y finalmente se verificó los plásmidos linealizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa.

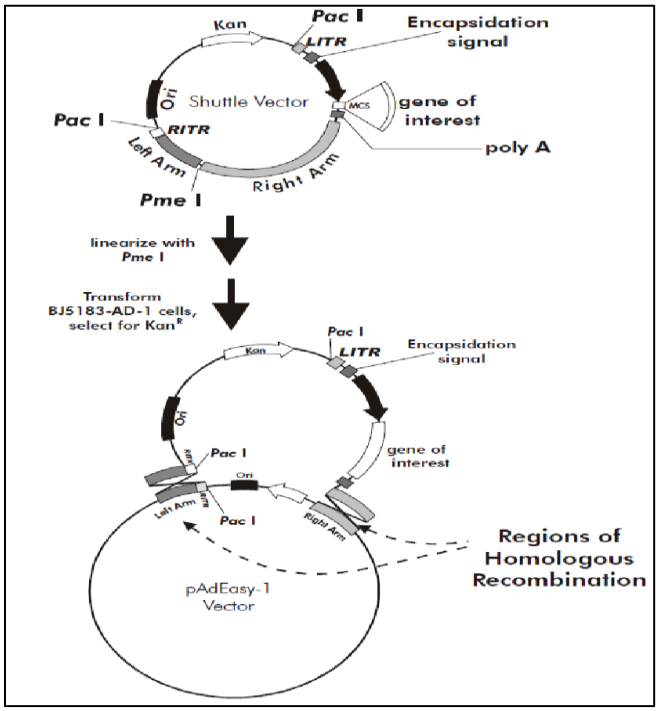


fig.7 recombinación homóloga entre el pShuttle-CMV con el inserto y el vector pAdEasy-1, se observan los brazos de homología en donde ocurre la recombinación.

*Tab. 9 concentración de reactivos usados para linealizar el plásmido pShuttle-CMV-HLA-B*44:02*

Reactivo	**pShuttle-CMV-HLA-B*44:02**
PmeI	0,5µl
Buffer CutSmart	2,5µl
Agua	21,3µl
Plásmido	0,7 (0,8µg)
Volumen total	**25,0**

Con los plásmidos linealizados y con el pAdEasy1 se transformaron las células BJ5183, para esto se conservaron las células en hielo junto con los plásmidos, se mezclaron las concentraciones registradas y se conservaron en hielo por 5 minutos. Luego se suministró un pulso de 2500V, 200Ω y 25µF con el electroporador Gene Pulser XcellTM de BioRad® a cada transformación. Enseguida se adicionaron 500µl de medio LB, se incubó a 37°C por 20 minutos, se pusieron en platos de agar-LB-kan distintas concentraciones de las células (100 y 400µl) y se dejaron creciendo toda la noche a 37°C. Ocho de las colonias más pequeñas se picaron y se pusieron a crecer en 5mL de medio de cultivo LB-kan toda la noche y se purificaron los plásmidos recombinantes por medio de una miniprep.

Tab. 10 volúmenes usados para la transformación de las células BJ5183

Reactivos	**Plásmido linealizado pShuttle-CMV-HLA-B*44:02**
Células *BJ5183*	40,0µl
pAdEasy1 (1µg/µl)	1,0µl
pShuttle-CMV-HLA-I linealizado	5,0µl

Realizada la recombinación del pShuttle con el pAdEasy1, se usaron los plásmidos obtenidos para transformar células XL-10 con el fin de aumentar su concentración, teniendo el vector adenoviral recombinante contenido en XL10-gold, células diseñadas con el fin de amplificar el plásmido del adenovirus recombinado. Para comprobar la presencia del plásmido recombinante que posee el vector de clonación Pshuttle el cual en su genoma está inserto el gen de interés HLA-B*44:02 y el esqueleto del adenovirus pAdeasy-1, se procedió a realizar una PCR dúplex utilizando los iniciadores KanaFor y KanaRev que amplifican un fragmento del gen de la

resistencia a la kanamicina contenido en el Pshuttle de 350pb y los AdFor y AdRev que amplifican un fragmento de 780 pb del genoma del adenovirus. Se comprobó su tamaño por electroforesis en gel de agarosa, Posteriormente, identificados los clones que portaban el vector adenoviral recombinante, se realizó una PCR específica para verificar la presencia del gen de interés

Tab. 11 cebadores usados para la PCR convencional.

	Cebador	**Secuencia**	**Temperatura de hibridación**
1	**KanaFor**	5’-CAAGATGGATTGCACGCAGG-3’	60°C
2	**KanaRev**	5’-AAGGCGATAGAAGGCGATGC-3’	60°C
3	**AdFor**	5’-GGCTGCTCTGCTCGGAAGAC-3’	60°C
4	**AdRev**	5’-GGCATACGCGCTACCCGTAG-3’	60°C
5	**pShuttle-CMV F**	5’-GGTCTATATAAGCAGAGCTG-3’	50°C
6	**pShuttle-CMV R**	5’-GTGGTATGGCTGATTATGATCAG-3’	50°C

Identificado el gen de interés, para poder liberar y aislar el ácido nucleico contenidos en XL10-gold, se llevó a cabo una miniprep.

7.2.6 Cuantificación de los productos de PCR

Con el plásmido aislado y para medir la proporción de plásmido a usarse, para realizar la transfección, se usaron dos métodos de cuantificación, uno por NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers y el otro por Qubit Flex Fluorometer preparado con el kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Ver anexo: preparación de DNA para cuantificación Qubit), ambos de la casa ThermoFisher Scientific.

Se compararon estos dos métodos de cuantificación del producto de PCR: uno utilizando el NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer y el otro utilizando el kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, ambos de la casa ThermoFisher Scientific. El Nanodrop™ es un espectrofotómetro compacto de luz Ultravioleta-Visible, que se basa en la absorción intrínseca de los ácidos nucleicos, al medirse el espectro de absorción, los ácidos nucleicos absorben la luz; esta señal, que es la atenuación de la luz que llega al detector después de pasar a través de la muestra, va a ser medida por espectrofotómetro, en relación con la luz que incide y va a ser expresada en valores de absorbancia de la muestra contenida en la solución. La medición fluorométrica del Qubit, va estar basada en fluorogénicos específicos para cada ácido nucleico o proteína. El fluorogénico se une en segundos y alcanza el equilibrio en menos de dos minutos. Para una cantidad específica de colorante, la medida de señal fluorescente de la mezcla es proporcional a la concentración de muestra. El fluorímetro convierte la señal de fluorescencia en concentración utilizando estándares de concentración conocida.

Para realizar la transcomplementación, se linealizó el plásmido con la enzima de restricción *Pac I*, que realiza un corte cohesivo en una secuencia palindrómica, como se relaciona a continuación



Fig. 8 corte de la enzima de restricción PacI

*Tab. 12 concentración de reactivos usados para la digestión del plásmido pAd1-CMV-HLA-B*44:02*

Reactivos	**Plásmido recombinante**
	pAd1-CMV-HLA-B*44:02
PacI	3µl
Buffer CutSmart	15µl
DNA (3µg)	100µl
Agua	32µl
Volumen total	**150**µl

7.3 Transfección de las células ad293

Recuperado y cuantificado el plásmido recombinante adenoviral, se usó la línea celular Ad293 para generar los adenovirus recombinantes. Estas células son modificadas de las HEK293 (células embrionarias de riñón), ya que tienen una mayor capacidad de adhesión. Adicionalmente, estas células tienen el gen E1 necesario para la replicación del adenovirus (Louis, Evelegh, Graham, 1997). De esta manera, se produce suficiente suma de adenovirus recombinantes defectivos de replicación.

Una vez linealizado el plásmido, se realizó la transfección de las células Ad293 por medio del kit de transfección ViraPack Transfection Kit de la casa Agilent, Estados Unidos. $1x10^6$ células se crecieron durante 24 horas antes de la transfección en una caja de 25 cm^2 en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y antibióticos al 1% con el fin de obtener una confluencia del 70% - 80%, se diluyó 3 ug de DNA (plásmido linealizado previamente con la enzima pacI) en 225 µl de H2O estéril en un tubo Falcon de poliestireno de 15 ml, a esta mezcla se le adicionó 25 µl de solución 1 y 250 µl de solución 2 del kit ViraPack Transfection Kit de Stratagene® y se mezcló gentilmente, se incubó durante 20 minutos. Mientras tanto, a parte, se removió el medio

de cultivo de la caja de cultivo por aspiración, se lavó dos veces con PBS y se le adicionó 2 ml de medio de cultivo previamente preparado, el cual contenía un 7% de solución 3 (MSB) y cloroquina en una concentración de 25μM a la caja 30 minutos antes que se hiciera la adición de la suspensión de DNA.

Se le adicionó gota a gota el DNA en suspensión a la caja de cultivo, mientras era agitada, se incubó durante 3 horas a 37°C con CO2 al 5% y luego se verificó la formación de un precipitado granular, posteriormente se retiró el medio de cultivo por aspiración y se lavó con PBS. Se le adicionó 2 ml de medio suplementado y con cloroquina en una concentración de 25μM, para ser llevada a incubación nuevamente durante 7 horas, donde fue removido el medio con cloroquina, se le adicionó medio suplementado y nuevamente fue llevado a incubación durante 8 días.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS

8.1 *Determinar las condiciones óptimas del cultivo celular para las células ad293*:

La determinación de las condiciones del cultivo celular para las células AD293, se dificultó debido a la metodología empleada inicialmente que consistía en retirar del nitrógeno y mezclar directamente con el medio de cultivo sin retirar el medio de congelación, al cabo de una semana, las células no se adherían a la caja de cultivo como se observa en la figura 9. Sin embargo, con la otra metodología empleada, retirando el medio de cultivo, al cabo de una semana se observaron agrupaciones celulares, en diferentes lugares de las cajas de cultivo celular, por lo cual, en adelante se continuó el manejo de las células siguiendo la metodología de descongelar a 37°C y retirar el medio de congelación.

Los parámetros más importantes para preservar la viabilidad de la línea celular después de la descongelación son la incubación a 37°C en baño serológico, ya que entre más rápido sea el proceso de descongelación, se incrementa la viabilidad celular. El otro factor que amplía la viabilidad celular, es la velocidad con que se va a retirar el crioprotector, en este caso, dimetilsulfóxido (DMSO), ya que el DMSO es tóxico para las células. El segundo método de descongelación fue el elegido para continuar con los ensayos.

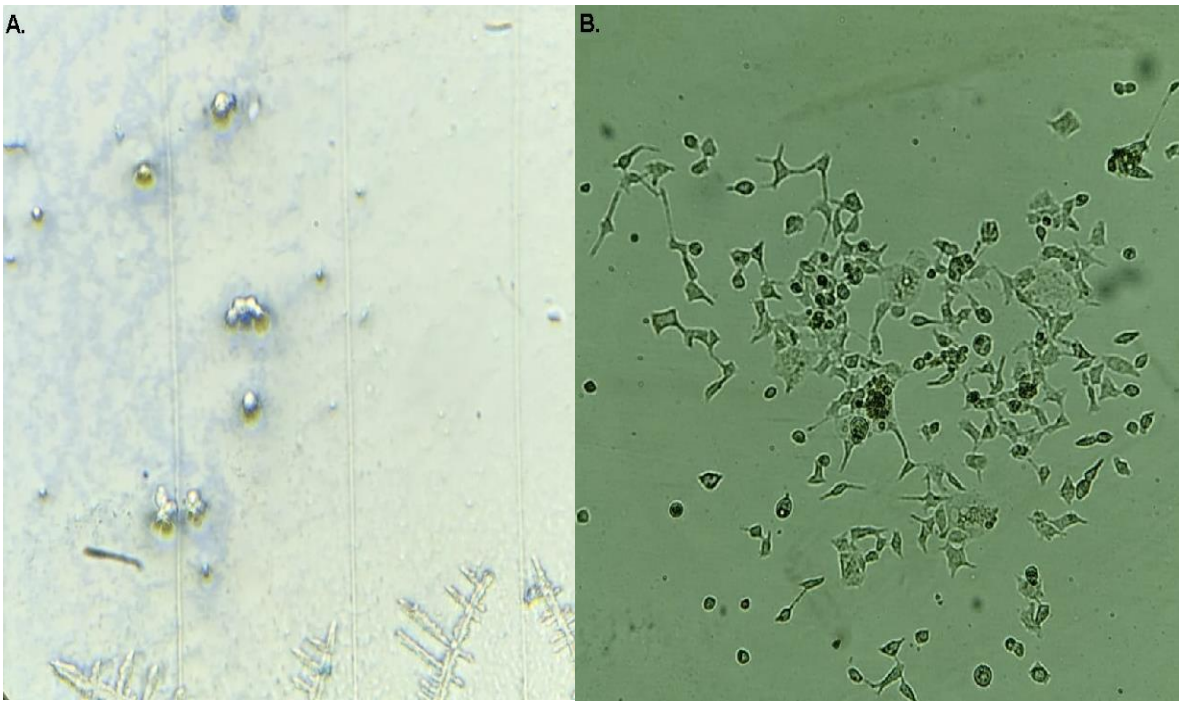


Fig. 9 diferencia de la viabilidad celular al cabo de una semana por diferentes métodos de descongelamiento. A. Método de descongelamiento donde se lleva directamente del tanque de N_2 líquido a la caja de cultivo. B. Método al que se le aplica un choque térmico de 37°C y retiro del crioprotector.

8.2 Construir los esqueletos adenovirales recombinantes para los genes que codifican HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02

8.2.1 Amplificación, secuenciación y clonación del gen de en los resultados van los resultados, HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02

A. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar los genes HLA-A*02:01 HLA-B*44:02 y electroforesis en gel de Agarosa

Los alelos A*02:01 y B*44:02 de HLA-I se escogieron para construir los adenovirus debido a que HLA-A*02:01 es uno de los alelos HLA-A más frecuentemente expresados en nuestra población, por lo cual, si se llegara a desarrollar este adenovirus como una terapia neoadyuvante para la inmunoterapia del cáncer, podría ser aplicado a un mayor porcentaje de los pacientes cuyos tumores tengan alteraciones en la expresión de HLA. Por otra parte, el alelo HLA-B*44:02 fue escogido debido a que se ha reportado que, en cáncer de cuello uterino, es frecuente encontrar la pérdida de este alelo, por lo cual se presume que puede ser importante para la presentación de los antígenos tumorales más inmunogénicos. Con las condiciones de PCR descritas en la metodología se logró la amplificación de ambos alelos HLA-I, cuya identidad se verificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa. La figura 10 muestra el resultado de la electroforesis, donde se puede observar el corrido electroforético de los productos de la PCR correspondientes a los genes que codifican estos alelos amplificados.

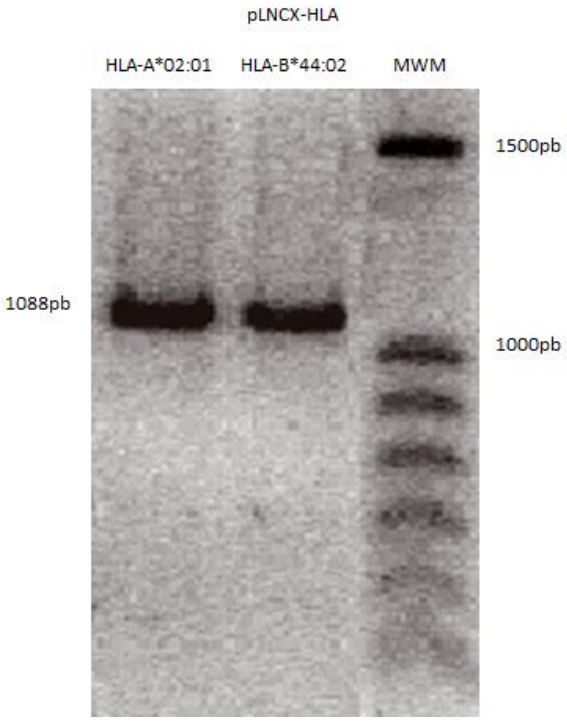
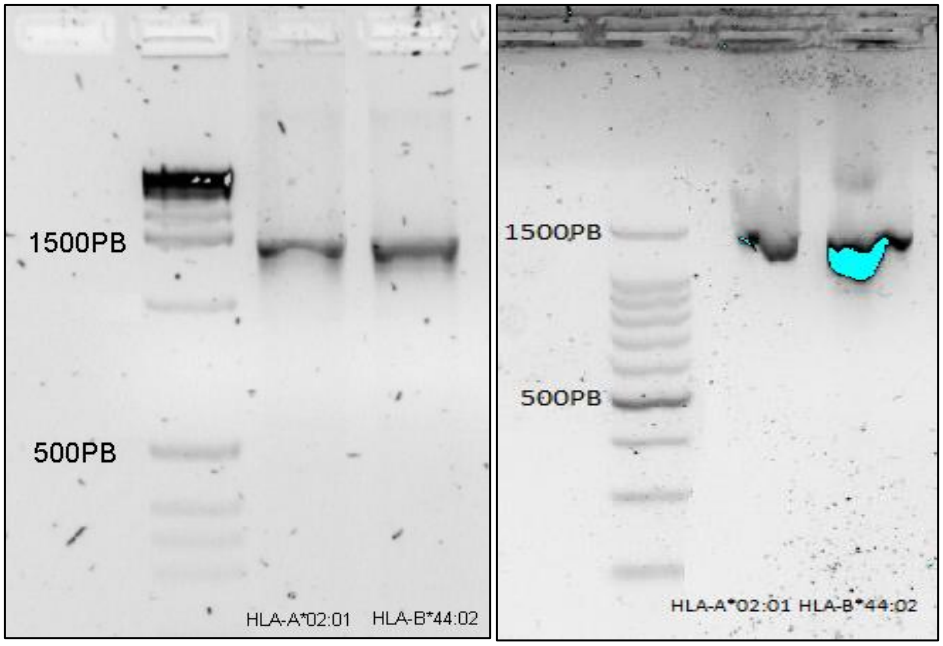


*Fig.10 Amplificación de los alelos HLA-I a partir de los plásmidos pLNCX Columnas 1 y 2: alelos HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02 respectivamente, columna 3: Marcador de peso molecular. (Molecular weigth marker)*

B. Secuenciación de los genes amplificados

Una vez verificado el tamaño de los amplímeros obtenidos con la PCR de los plásmidos pLNCX, se realizó la purificación de estos productos de PCR para secuenciarlos. Como se mencionó en la metodología, la purificación del producto de PCR se realizó a partir de la banda obtenida en la electroforesis en gel de agarosa. El objetivo de la secuenciación por el método de Sanger, es determinar la secuencia de nucleótidos para identificar variantes de secuencia y en este caso, permite verificar que el gen que será clonado fue amplificado correctamente por la Taq DNA polimerasa, sin introducir errores en la secuencia (França, Carrilho & Kist, 2002).



a b

Fig. 11 DNA purificado y amplificado. a) Banda correspondiente al producto de PCR previo a la purificación de banda b) Banda correspondiente al producto de PCR después de la purificación de banda, la intensidad de la banda es mayor.

El resultado de la secuencia para el gen de HLA-B*44:02 en la figura 12 nos muestra el electroferograma obtenido a partir de la electroforesis capilar del producto amplificado con los reactivos de secuencia. La lectura se realiza con bases en el orden de disposición de los diferentes nucleótidos. Nos muestra el orden de las bases a partir de curvas de fluorescencia, una por cada base, cada una de las bases le corresponde un color que el equipo interpreta como un pico y en la parte superior le asigna la base correspondiente, para T (timina) se asignó el color rojo, para A (adenina) se asignó el color verde, para C (citosina) se asignó el color gris y finalmente para G (guanina) se asignó el color blanco; observamos que esta secuencia es correcta, ya que cada base corresponde un pico bien definido y la presencia de ruido en la secuencia fue mínima. Al hacer la comparación con otras secuencias disponibles, por medio de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) se determinó que el gen secuenciado fue correcto, ya que la homología del gen HLA-B*44:02 fue de un porcentaje de identidad del

99.76% a excepción, posiblemente del principio, que puede ser debido a que es una zona donde van a pegarse los cebadores al momento de realizar la secuencia. Esto se puede observar en la figura 13 donde se graficó la homología del gen, donde se puede ver el consenso entre las secuencias.

Mientras para la secuencia de HLA-A*02:01, los resultados de la secuencia tanto para el cebador directo como reverso, al momento de evaluar el electroferograma, presentó bastante ruido lo que indicaba que posiblemente no secuenció de manera correcta o era el gen incorrecto, se confirmó que este gen no seguía en el proyecto al momento de hacer la comparación con otras secuencias por medio de la herramienta BLAST, que arrojó una homología incluso menor del 60%, por tanto, se decidió continuar únicamente con el gen de HLA-B*44:02.

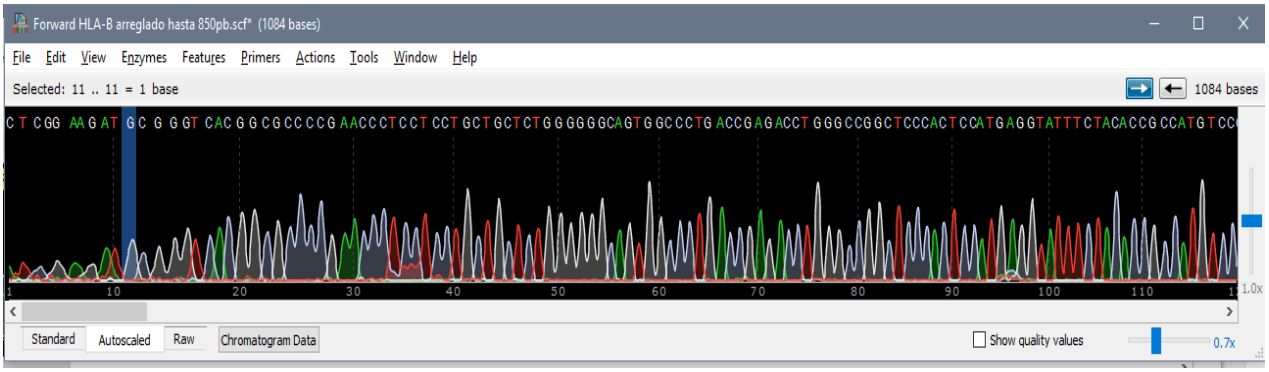


*Fig. 12 Electroferograma indicando la disposición de los nucleótidos en la secuencia HLA-B*44:02.*

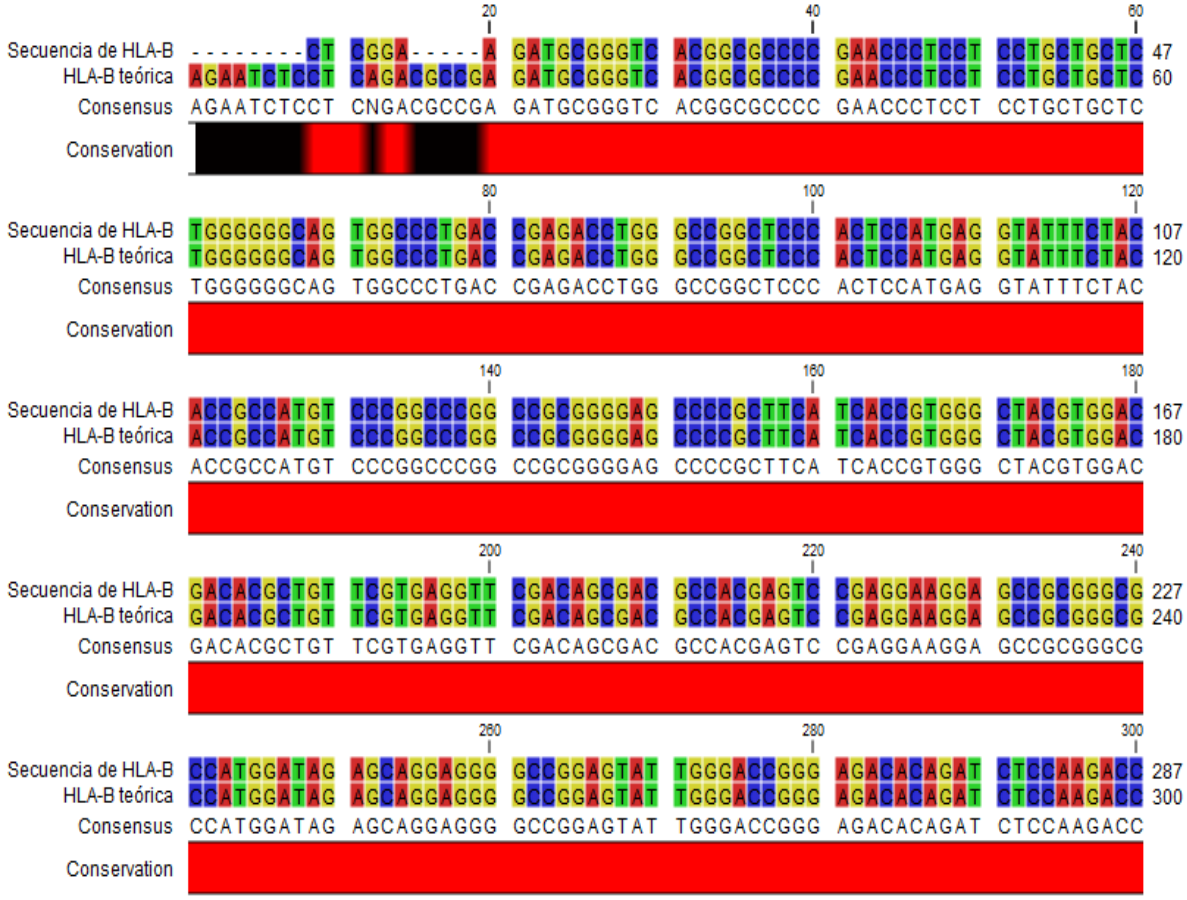


*Fig. 13 Blast de la secuencia del gen HLA-B*44:02 (secuencia de HLA-B) con una secuencia consenso (HLA-B teórica), permite observar la homología entre ambas secuencias.*

C. Clonación de los productos de PCR en el vector pShuttle-CMV:

Se logra confirmar la identidad del inserto en el vector pShuttle-CMV, esto debido a que la amplificación con los cebadores pShuttle (5-6) anillan en sectores del plásmido que flanquean con el sitio de multiclonaje y para las colonias evaluadas fue correcta, debido a que en la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de las colonias evaluadas se observó un producto de aprox. 1500pb, que corresponden al tamaño del gen más un segmento adicional que es del vector.

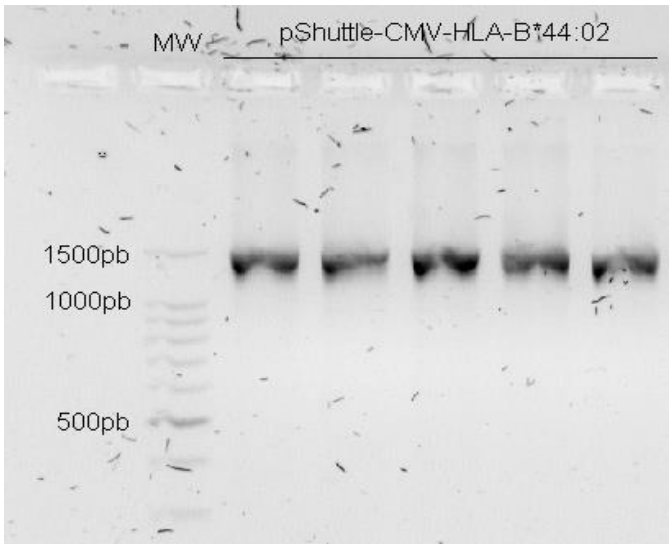


Fig. 14 Presencia del gen de HLA-B en células DH5α, la amplificación obedece al gen inserto en el sitio de multiclonaje del pShuttle-CMV, su suma nos va a dar un aproximado de 1500pb.

C. Recombinación homóloga en BJ5183 para la obtención del esqueleto del adenovirus recombinante:

El proceso de la recombinación homóloga se llevó a cabo en las bacterias BJ5183 que posee el gen *recA*, que le confiere una alta frecuencia de recombinación homóloga. Durante el pulso eléctrico que se aplicó a la mezcla de las bacterias, el pShuttle recombinante linealizado y el pAdEasy-1, los plásmidos ingresaron al citoplasma bacteriano, donde ocurrió la recombinación homóloga entre los brazos de homología derecho e izquierdo presentes en el pShuttle y en el pAdEasy. La mezcla fue sembrada en agar LB con kanamicina y al día siguiente se picaron las colonias para poner a crecer los recombinantes durante la noche para realizar la miniprep y obtener los esqueletos adenovirales recombinantes. Una vez obtenidos, se realizó la PCR específica para HLA-B*44:02 y una PCR dúplex con los cebadores para pAdeasy y Kanamicina.

La figura 15, PCR específica para el gen de HLA-B*44:02, nos permite observar que después de la recombinación homóloga, no se perdió la presencia del gen en el plásmido recombinante y

en la figura 16, tenemos la amplificación de una PCR dúplex con cebadores para un sector que anilla en el vector pAdEasy-1 y otro en el vector pShuttle, confirmándonos el éxito de la recombinación homóloga, ya que anilla dos sectores de ambos plásmidos.

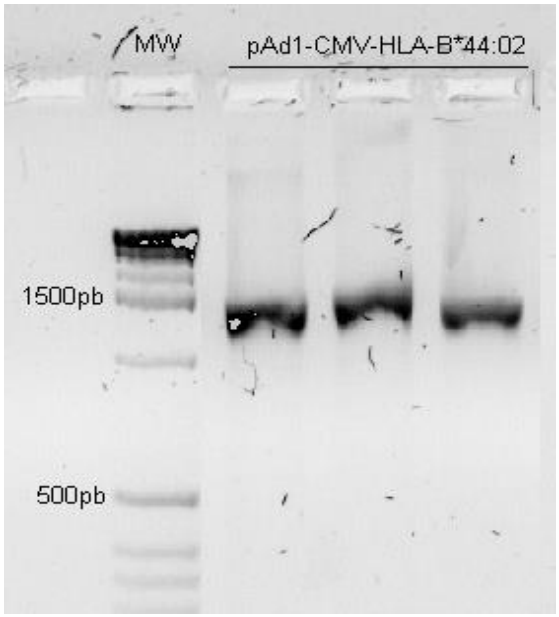


*fig. 15 PCR específica para el gen de HLA-B*44:02.*

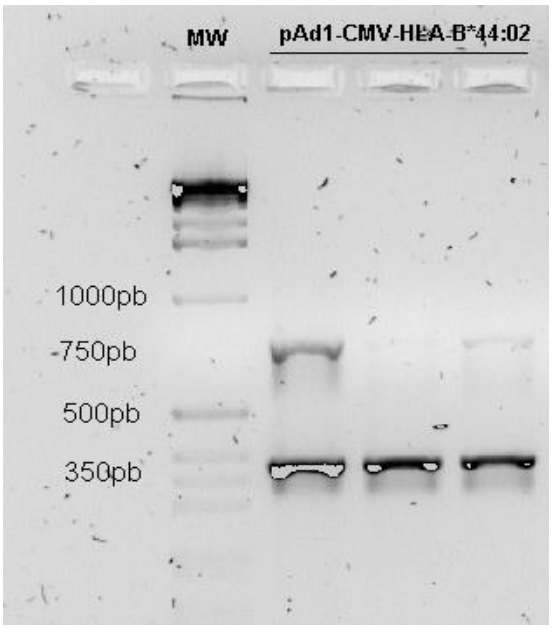


Fig. 16 PCR dúplex, con los cebadores 1, 2, 3 y 4 de la tabla 11 que anillan en un sector del pAdEasy1, amplificando un fragmento de aprox. 350pb y en un sector del pShuttle donde amplifica un fragmento de aprox. 780pb.

D. Conservación del esqueleto adenoviral en bacterias XL-10

Las bacterias ultracompetentes XL10-Gold se usaron para almacenar el adenovirus recombinado sin que continuara la recombinación homóloga durante el tiempo de crecimiento bacteriano para obtener el plásmido con el que se realizaría la trans complementación en las células Ad293 para obtener el adenovirus recombinante. Esta cepa es deficiente en endonucleasa (*endA1*) y deficiente en recombinación (*recA*). La mutación *endA1* mejora la calidad del DNA plasmídico obtenido por miniprep, y la mutación *recA* garantiza la estabilidad del inserto.

8.2.2 Cuantificación de los plásmidos pAd1-CMV-HLA-B*44:02

Los métodos de cuantificación de DNA utilizados en el ensayo, presentaron una variabilidad notable en ciertas muestras, presentado el método de Qubit unas mejores prestaciones y más precisas al momento de hacer hasta tres cuantificaciones y encontrar valores que no se alejan tanto, lo que permite que al calcular la media los resultados no aumenten su tasa de error; fenómeno que sí sucedió en el método de cuantificación por Nanodrop, donde llegó a arrojar valores incluso negativos y valores muy altos, aumentando la dispersión de los datos, por lo tanto, la tasa de error; lo que puede deberse a que el Nanodrop va a cuantificar todo aquello que se encuentre en la solución y la absorbancia puede variar debido a ello, mientras, por el método de Qubit, la especificidad va a darse por el kit, ya que el fluorómetro será específico ya sea para DNA, RNA o proteína. Las cantidades tienen cierto grado de variabilidad como en las muestras número 3, esto puedo ser debido la precisión más acertada del método Qubit; también, las cantidades variaron en múltiples ensayos, en un principio la cantidad de DNA plasmídico era muy bajo, lo que cambió al momento en que se intensificó el uso de la temperatura en todo el

proceso de la purificación del DNA a partir de las XL10, aun así las cantidades fueron menores a las esperadas, posiblemente por la continua descongelación de las células XL10, células que son sensibles a la temperatura y debe conservarse por lo general en -80°C y los choques térmicos como la puesta en hielo, pudo afectar la calidad del DNA plasmídico.

Tab. 13 cuantificación por el método de Qubit

HLA-B*44:02	**Volumen en µg/µl**
1	0.0925
2	0.0464
3	0.8976
4	0.3481

Tab. 14 cuantificación por el método de Nanodrop 2000

HLA-B*44:02	**Volumen en µg/µl**
1	0.0736
2	0.0611
3	2.0556
4	0.1244

8.3 Producir el adenovirus recombinante en células Ad-293:

Para ello se realizó la transfección del esqueleto adenoviral mediante el uso de la lipofectamina. Se esperaba que con esta transfección se generara una cantidad suficiente de los adenovirus recombinantes para el gen silvestre de la cadena pesada de HLA-B*44:02 y con ellos se infectarían las células SiHa, que son homocigotas para la expresión de HLA-I probablemente debido a una pérdida de un haplotipo completo para comprobar si se expresan estos alelos en la superficie celular.

Se obtuvo resultados de la transfección por medio de las indicaciones dadas en el kit el cual indicaba el precipitado granular que se puede observar en la fig. 17, donde se compara el cultivo celular con precipitado granular, cultivo transfectado frente al cultivo celular sin transfectar.

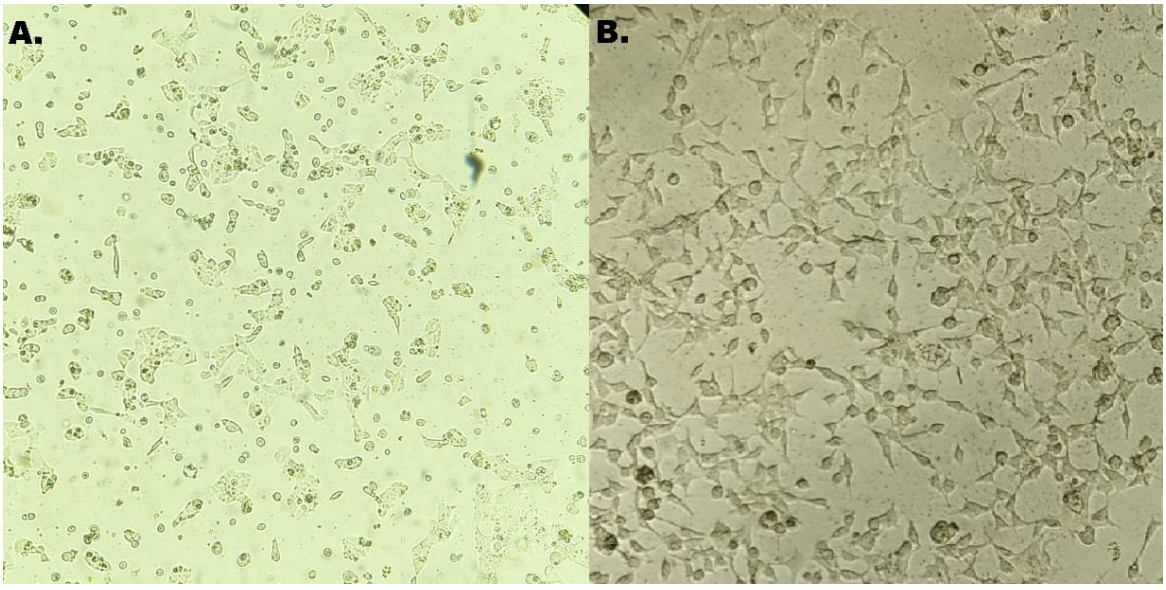


Fig. 17 Comparación de las células antes y después de la transfección. A.) Células con precipitado granular en 20x. B.) Células en estado de crecimiento normal 40x.

Finalmente se dejó después de la transfección con 4ml de medio DMEM en la incubadora a 37°C con CO_2 al 5%, pero al momento de revisar, los resultados que se esperaban observar, como el efecto citopático, no se logró, debido a que el medio estaba sumamente metabolizado y las células despegadas, lo cual en primera instancia se asumió como una posible contaminación, pero al momento de revisarlas al microscopio no se observaban bacterias, así que la hipótesis que más se apoya es una posible alta densidad población celular, lo que hizo que en dos días el consumo del medio fuera de forma muy acelerado.

Luego, al momento en que se iba a repetir el ensayo, para ajustar los posibles errores metodológicos, el Instituto Nacional de Cancerología, debido a la pandemia, sólo permitió el ingreso de personal asistencial y finalmente, por el resto de 2020, se cerró el ingreso a estudiantes de pregrado, evitando así, poder repetir el ensayo para alcanzar el resultado final.

9. CONCLUSIONES:

Se lograron las condiciones óptimas para la descongelación y cultivo celular para las células Ad-923 transfectadas de manera estable con el gen E1 del adenovirus que es indispensable para la replicación del ácido nucleico del virus y generar altos títulos y de forma estable el genoma recombinante que posee este virus para poder infectar células tumorales.

Se amplificaron los genes que codificaban HLA-A*02:01 y HLA-B*44:02, a partir de plásmidos pLNCX/HLA-A*02:01 y pLNCX/HLA-B*44:02, lo que nos permitió observar la presencia del gen y que éste fuera el correcto, ya que la importancia de la aplicación terapéutica de los genes descritos es alta, debido a ser de los alelos que menos presencia hay en los tumores.

Se obtuvo el genoma adenoviral recombinante para el alelo HLA-B*44:02 para ser amplificado en células Ad-293 (HEK-293 transfectadas de manera estable con un plásmido que codifica la proteína E1 del adenovirus), mediante transfección con lipofectamina y así poder establecer su posible futuro uso en ensayos clínicos para restablecimiento de la molécula de HLA, molécula fundamental en la respuesta inmune frente a células tumorales, un avance que podría permitir dar un paso más en la lucha contra el cáncer.

10. ANEXOS

Anexo: Protocolo de purificación de DNA con fenol-cloroformo

1. Adicionar un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 a la solución de DNA.
2. Agitar vigorosamente y centrifugar 15 segundos a temperatura ambiente.
3. Remover la fase acuosa y colocar en otro tubo. Si hay presencia de un precipitado blanco realizar nuevamente la extracción.
4. Adicionar 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5,2 a la solución de DNA y mezclar.
5. Adicionar entre 2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar vigorosamente y colocar en hielo seco (-80°C) por 5 minutos o más.
6. Centrifugar por 5 minutos a 14000 rpm y retirar el sobrenadante.
7. Lavar con 1 ml de etanol al 70% y centrifugar nuevamente.
8. Retirar el sobrenadante y dejar secar.
9. Resuspender el pellet en 100µl de agua libre de nucleasas o buffer TE.

Adaptado de: (Sambroook & Russell, 2001)

Anexo: preparación de DNA para cuantificación Qubit.

1. Prepare en un tubo (o más dependiendo la concentración de las muestras) de 1.5 ml una mezcla de 1µl del fluorómetro y 199 µl de buffer por cada muestra a cuantificar.

2. En un tubo de 0.6 mL se adicionará 10 µl del Standar #1 junto con 190 µl de la mezcla preparada en el paso 1 y de igual forma se procederá para el Standar #2.

3. Para el DNA se adicionará 1µl de DNA y 199 µl de la mezcla.

11. BIBLIOGRAFÍA

Acebes, A. (2015). Desarrollo de estrategias de activación de la respuesta inmune antitumoral mediada por células NK. Programa de Doctorado de Investigación en Cáncer. Universidad de Oviedo, 2-6.

Alméciga, C.J., H. Sáenz & L. A. Barrera (2006): Estado actual, consideraciones éticas y perspectivas de la terapia génica en errores innatos del metabolismo. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 30(117): 525-540.

Amer, M.H. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. Mol and Cell Ther 2, 27 (2014). https://doi.org/10.1186/2052-8426-2-27

Anderson WF. The Best of Times The Worst of Times. Science. 2000; 288: 627-629

Andrews JL, Kadan MJ, Gorziglia MI, Kaleko M, Connelly S. Generation and characterization of E1/E2a/E3/E4-deficient adenoviral vectors encoding human factor VIII. Mol Ther. 2001;3(3):329-336. doi:10.1006/mthe.2001.0264

Annan AC, Fisher PB, Dent P, Siegal GP, Curiel DT. Gene Therapy in the Treatment of Human Cancer. En: Coleman WB, Tsongalis GJ, editores. The Molecular Basis of Human Cancer [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 p. 811–41.

Castillo L., Arnáez C. (2006). Terapia inmunogénica y cáncer. Una esperanza bien fundamentada. El farmacéutico, 548, 12-17.

Carretero R., Gil-Julioc H.,Vázquez-Alonso F.,Garridoa F.,Castineiras J. Y cózar J.M. (2013). Implicación de las moléculas HLA de clase I en el escape inmunitario de tumores urológicos. Actas Urológicas Españolas, 38(3), 192-199.

Carvallo Pilar (2017) conceptos sobre genética humana para la comprensión e interpretación de las mutaciones en cáncer y otras patologías hereditarias Revista Médica Clínica Las Condes Volume 28, Issue 4, July–August 2017, Pages 531-537

Chapel H., Haeney M., Misbah S., and Snowden N., Essentials of Clinical Immunology, edited by: John Wiley & Sons, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, 6th edition, 2014.

Chen Y, Gao D-Y, Huang L. In vivo de-livery of miRNAs for cancer therapy:Challenges and strategies. Adv DrugDeliv Rev. enero de 2015;81:128–41.

Chen DS, Mellman I. Elements of can-cer immunity and the cancer–immuneset point. Nature. 18 de enero de 2017;541(7637):321–30

Chinea R. Beatriz (2018) Gene therapy: Viral vectors and applications, Psychologia Latina 2018, vol. Especial, 67-69

Chinén J. (2000). Vectores virales para terapia genética. DIAGNÓSTICO, 39(6), 10.

Contreras-Verduzco, Morales-Vázquez, Medina-Torres, Espinosa-Padilla, 2014, Diagnóstico oportuno de la inmunodeficiencia combinada grave (SCID) a través del tamiz neonatal. Alergia, asma e inmunologías pediátricas. Vol. 23, No. 2, pp 48-56

Cross, D., & Burmester, J. K. (2006). Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. Clinical medicine & research, 4(3), 218–227. https://doi.org/10.3121/cmr.4.3.218

De León, Joel, & Pareja, Arturo. (2018). Inmunología del cáncer I: bases moleculares y celulares de la respuesta inmune antitumoral. Horizonte Médico (Lima), 18(3), 80-89. https://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n3.11

Del Campo, A. B., Carretero, J., Muñoz, J. A., Zinchenko, S., Ruiz-Cabello, F., González-Aseguinolaza, G., Garrido, F., & Aptsiauri, N. (2014). Adenovirus expressing β2-microglobulin recovers HLA class I expression and antitumor immunity by increasing T-cell recognition. Cancer gene therapy, 21(8), 317–332. https://doi.org/10.1038/cgt.2014.32

Doerfler W. A New Concept in (Adenoviral) Oncogenesis: Integration of Foreign DNA and its Consequences. Biochemistry Biophysics Acta 1996; 1288: F79-99.

Dusty Miller A., Daniel G. Miller, J. Victor Garcia, Carmel M.Lynch. (1993). Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. Methods in Enzymology, 217, 581-599

Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mblawa C, Kohler B, Piñeros M, et al.(2013) Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X. IARC

G. Knudson Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma Proc Natl Acad Sci USA, 68 (1971), pp. 820-823

Garrido F., Perez F., Bernal M., Sánchez-Palencia A., Aptsiauri N. and Ruiz-Cabello F. . (2017). The Escape of Cancer from T Cell-Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture. Vaccines, 5,7, 10.

Gastón U. (2014). LESIÓN Y MUERTE CELULAR. Revista de Actualización Clínica Investiga, 43, 12.

Graeber C., (2018) The Breakthrough: Immunotherapy and the Race to Cure Cancer.

Gonçalves, G., & Paiva, R. (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives. Einstein (São Paulo, Brazil), 15(3), 369–375.

H. Chial Tumor suppressor (TS) genes and the two-hit hypothesis Nature Education, 1 (1) (2008), p. 177

Hunt, S. (2008) Controversies in treatment approaches: Gene therapy, IVF, stem cells, and pharmacogenomics. Nature Education 1(1):222

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 1992;11:3887–3895

Kent, L. Freezing and Thawing Human Embryonic Stem Cells. J.Vis.Exp. (34), e1555, doi:10.3791/1555 (2009)

ander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C: Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001, 409 (6822): 860-921. 10.1038/35057062.

Lastra O. (2006). TERAPIA GÉNICA. Artemisa en línea, 22, 38.

Linet MS. Evolution of cancer epidemiology. Epidemiol Rev. 2000;22(1):35–56.

Lippert-Rasmussen, K. (2002). Gene Therapy and Ethics. Journal medic ethics, (28), 56-62.

Marin-Acevedo J.A., Soyano A. E., Dholaria B., Knutson K. L., Lou Y. Cancer immunotherapy beyond immune checkpoint inhibitors. J Hematol Oncol. 2018; 11: 8- 33.

Morales, Fernando. (2018). Terapia génica en el arsenal de terapéutica de la enfermedad oncológica. Revista Clínica Escuela de Medicina UCR-HSJD. 8. 10.15517/rc_ucr-hsjd.v7i1.32652.

Najafimehr, H., Hajizadeh, N., Nazemalhosseini-Mojarad, E., Pourhoseingholi, M. A., Abdollahpour-Alitappeh, M., Ashtari, S., & Zali, M. R. (2020). The role of Human leukocyte antigen class I on patient survival in Gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. Scientific reports, 10(1), 728. https://doi.org/10.1038/s41598-020-57582-x

Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., 3rd, & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy, 31(4), 317–334. https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5

Novelli G, Gruenert DC. Genome medicine: gene therapy for the millennium. Pharmacogenomics. 2002;3(1):15-18. doi:10.1517/14622416.3.1.15 Prehn RT, and Main JM: Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. J. Natl. Cancer Inst 1957; 18: 769.

Patil, Santosh & Al-Zoubi, I.A. & Raghuram, P.H. & Misra, Neeta & Yadav, N. & Alam, Mohammad. (2018). Gene therapy: A comprehensive review. International Medical Journal. 25. 361-364.

Rodríguez, J.A. (2017). HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair clinical outcomes via T-cell activation (Review). Oncology Letters, 14, 4415-4427. https://doi.org/10.3892/ol.2017.6784

Rodríguez J.A., Martínez L.M, Cruz N. y Combita A. (2014). Terapia génica para el tratamiento

del cáncer. Revista colombiana de cancerología, 18(1), 27-40.

Rodríguez Yunta, Eduardo. (2003). A TERAPIA GÊNICA E OS PRINCÍPIOS ÉTICOS. Acta bioethica, 9(1), 69-79.

Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. J Immunol 2014;192:5451–8.

Ruiz Castellanos, M., & Sangro, B.. (2005). Terapia génica: ¿Qué es y para qué sirve?. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 28(1), 17-27. Recuperado en 12 de noviembre de 2018

Salazar J., Sánchez P. (2014). El cáncer. Padre Mier No. 909 poniente, esquina con Vallarta Centro, Monterrey, Nuevo León, México, C.P. 64000: La ciencia a tu alcance.

Salazar O., Flavio. (2000). El sistema inmune, herramienta estratégica en la batalla contra el cáncer. Revista chilena de pediatría, 71(4), 296-306.

Sambrook, J., & Russell, D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez, Catherine. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. Revista Médica Clínica Las Condes. 24. 553-562. 10.1016/S0716-8640(13)70659-X.

Sangro B, Herraiz M, Prieto J. Gene therapy of neoplastic liver diseases. Int J Biochem Cell Biol. 2003;35:135-48

Sobrevilla-Navarro A., Armendáriz-Borunda J., Salazar-Montes A. (2015). En la terapia génica con adenovirus la respuesta inmune es el principal enemigo The immune response is the worst enemy of adenovirus-based gene therapy. Salud(i) Ciencia, 21, 165-170.

Vélez A. y Sánchez L., 2013, (2013). Terapia génica: una opción de tratamiento y una controversia ética Gene therapy: a treatment option and an ethics controversy. Revista Salud Uninorte, 29(2), 341-350.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. Annu Rev Immunol. 2011; 29:235-71

Walters L., Palmer, JG. 1997. The ethics of human gene therapy. Oxford University Press, New York. pp. 60-98

World Health Organization (WHO). Demographic and socioeconomic statistics: Census and civil registration coverage. Data by country. 2018