

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS

**GENERACIÓN DE INTERLEUCINA 18 HUMANA Y PROTEÍNA
REGULADORA E2 RECOMBINANTES Y SU POTENCIAL APLICACIÓN
EN LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER**

POR

JORGE SOLÍS ESTRADA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

ENERO, 2017

**Generación de Interleucina 18 Humana y proteína reguladora E2
recombinantes y su potencial aplicación en la terapia contra el cáncer**

Aprobado por Comité de Tesis

Dr. Isaías Balderas Rentería
ASESOR

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinosa
COASESOR

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio
COMITÉ TUTORIAL

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
COMITÉ TUTORIAL

Dr. Omar González Santiago
COMITÉ TUTORIAL

Dra. María A. Hernández Ramírez
SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tabla de Contenido

RESUMEN	7
CAPÍTULO 1	9
1.- INTRODUCCIÓN.....	9
CAPÍTULO 2	18
2.- ANTECEDENTES	18
2.1.- Interleucina 18 como agente Inmunoterapéutico	18
2.2.- E2 como proteína terapéutica	23
CAPÍTULO 3	26
CAPÍTULO 4	28
4.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
4.1.- Hipótesis	28
4.2.- Objetivo General	29
4.3.- Objetivos Específicos	29
CAPÍTULO 5	30
5.- METODOLOGÍA.....	30
5.1.- Material y ubicación de equipos.....	30
5.2.- METODOLOGÍA GENERAL.....	32
5.3.- OPTIMIZACIÓN DEL GEN INTERLEUCINA 18 HUMANA, E2 DE VPH 16 Y DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	32
5.3.1.- Optimización del gen Interleucina 18 humana	32
5.3.2.- Obtención del gen E2.....	33
5.3.3.- Diseño de Oligonucleótidos.....	33
5.4.- AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERES POR PCR	34
5.4.1.- Amplificación del gen IL-18 por PCR.....	34
5.4.2.- Amplificación del gen E2 por PCR.....	35

5.5.- CONSTRUCCIÓN DE LOS PLASMIDOS RECOMBINANTES pThioHis-B/IL-18 y pThioHis-B/E2.....	37
5.5.1.- Digestión del producto amplificado IL-18 con las enzimas de restricción <i>Sal</i> I y <i>Kpn</i> I.....	37
5.5.2.- Digestión del producto amplificado E2 con las enzimas de restricción <i>Sal</i> I y <i>Kpn</i> I.....	38
5.5.3.- Digestión del plásmido pThioHis-B con las enzimas de restricción <i>Sal</i> I y <i>Kpn</i> I.....	39
5.5.4.- Reacción de ligación del vector pThioHis-B con el inserto IL-18 y E2.....	40
5.5.5.- Transformación bacteriana por células rubidio competentes con el vector recombinante.....	41
5.5.6.- Selección de clonas transformadas y extracción de ADN plasmídico.....	42
5.5.7.- Confirmación de transformantes por PCR.....	43
5.5.8.- Subclonación bacteriana por células rubidio competentes con el vector recombinante.....	44
5.6.- EXPRESIÓN PILOTO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	45
5.6.1.- Electroforesis en gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para la detección de las proteínas recombinantes.....	46
5.6.2.- Escalamiento de la expresión de proteínas.....	47
5.6.3.- Lisis celular y obtención de clarificados.....	48
5.7.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	48
5.7.1.- Cromatografía de Afinidad para las proteínas recombinantes Trx-IL18 y Trx-E2.....	48
5.7.2.- Diafiltración para la remoción de Imidazol y Cloruro de Sodio.....	50
5.7.3.- Determinación de la concentración de proteínas.....	50
5.8.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE IL-18 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES SANOS <i>in-vitro</i>	52
5.8.1.- Extracción de sangre periférica.....	52
5.8.2.- Exposición de sangre periférica a IL18.....	53
5.8.3.- Evaluación microscópica.....	53
5.9.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA <i>in-vitro</i> DE LA PROTEÍNA E2 EN CELULAS SIHA.....	54
5.9.1.- Ensayo con WST-1.....	54
5.9.2.- Ensayo por Caspasa 3.....	55
5.9.3.- Análisis Estadístico.....	56
5.10.- Manejo de los residuos de laboratorio.....	57

CAPÍTULO 6	58
6.- RESULTADOS.....	58
6.2.- Obtención del gen E2.....	60
.....	61
6.2.- Diseño de oligonucleótidos.....	61
6.3.- AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS POR PCR.....	62
6.3.1.- Amplificación del gen IL-18 por PCR.....	62
6.3.2.- Amplificación del gen E2 por PCR.....	62
6.4.- CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES pThioHis-B/IL-18 y pThioHis-B/E2.....	63
6.4.1.- Digestión de los genes IL-18, E2 y el plásmido pThioHis-B con las enzimas de restricción <i>Kpn I</i> y <i>Sal I</i>	63
6.4.2.- Reacción de ligación del vector pThioHis-B con el inserto IL-18 y E2.....	64
6.4.3.- Selección de clonas transformadas y extracción de ADN plasmídico.....	65
6.4.4.- Confirmación de transformantes por PCR.....	66
6.5.- EXPRESIÓN PILOTO DE PROTEINAS RECOMBINANTES.....	66
6.6.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	68
6.6.1.- Cromatografía de Afinidad para las proteínas recombinantes Trx-IL18 y Trx- E2.....	69
6.6.2.- Determinación de la concentración de proteínas.....	72
6.7.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE IL-18 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES SANOS <i>in-vitro</i>	73
6.8.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA <i>in-vitro</i> DE LA PROTEÍNA E2 EN CELULAS SIHA.....	75
6.8.1.- Ensayo con WST-1.....	75
6.8.2.- Ensayo por Caspasa 3.....	77
6.8.3.- Análisis Estadístico.....	78
CAPÍTULO 7	80
7.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	80
CAPÍTULO 8	86
8.- CONCLUSIONES.....	86

CAPÍTULO 9 87

9.- PERSPECTIVAS 87

REFERENCIAS 89

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO 96

Lista de Tablas

Tabla	Página
Tabla I. Volumen de reactivos utilizados para la amplificación del gen IL-18 por PCR	34
Tabla II. Condiciones de la amplificación del IL-18 por PCR	35
Tabla III. Volumen de reactivos utilizados para la amplificación del gen E2 por PCR	36
Tabla IV. Condiciones de la amplificación del gen E2 por PCR.....	36
Tabla V. Composición de la reacción de digestión del gen IL-18 con la enzima <i>Sal</i> I.....	37
Tabla VI. Composición de la reacción de digestión del gen IL-18 con la enzima <i>Kpn</i> I	38
Tabla VII. Composición de la reacción de digestión del gen E2 con la enzima <i>Sal</i> I.....	39
Tabla VIII. Composición de la reacción de digestión del gen E2 con la enzima <i>Kpn</i> I.....	39
Tabla IX. Composición de la reacción de digestión del plásmido pThioHis-B con la enzima <i>Sal</i> I	40
Tabla X. Composición de la reacción de digestión del plásmido pThioHis-B con la enzima <i>Kpn</i> I	40

Tabla XI. Composición de las reacciones de ligación entre el plásmido pThioHis-B y el gen IL-18, pThioHis-B y el gen E2.	41
Tabla XII. Volumen de reactivos utilizados para la amplificación del gen IL-18 y E2 por PCR.....	43
Tabla XIII. Condiciones de la amplificación del E2 por PCR.....	44
Tabla XIV. Composición del gel separador al 12%.....	47
Tabla XV. Composición del gel concentrador al 4%	47
Tabla XVI. Composición de las soluciones para cromatografía de afinidad	49
Tabla XVII. Composición del reactivo Bradford 5X	51
Tabla XVIII. Diseño de Oligonucleótidos para el gen Interleucina 18 y E2	61
Tabla XIX. Cuantificación de proteínas por el método Bradford	72
Tabla XX. Evaluación de actividad anticancerína en células SiHa	76

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1. A) Señalización de Interleucina 18 por el complejo de receptor	12
Figura 2. Estructura del genoma de VPH	14
Figura 3. Secuencia de nucleótidos del gen Interleucina 18.....	58
Figura 4. Gráficos del análisis del gen IL-18 nativo y la frecuencia de los codones para el sistema procariótico E. coli..	59
Figura 5. Gráficos del análisis del gen IL-18 optimizado.....	60
Figura 6. Secuencia de Nucleótidos del gen E2 con un tamaño de 1098 bp....	61
Figura 7. Gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen IL-18 (595 pb).....	62
Figura 8. Gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen E2 (1098 pb).....	63
Figura 9. Gel de agarosa al 1%. Digestión del gen IL-18, E2 y el plásmido pThioHis-B con las enzimas de restricción <i>Kpn</i> I y <i>Sal</i> I.....	64
Figura 10. Esquema general de clonación para IL-18 y E2	65
Figura 11. Confirmación de transformantes por PCR.	66
Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de la expresión de Trx-IL18 (35kDa)..	67
Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% de la expresión de Trx-E2 (54kDa).....	68
Figura 14. Análisis del proceso de purificación de Trx-IL18 (35kDa) por SDS-PAGE.....	69
Figura 15. Análisis del proceso de purificación de Trx-E2 (54kDa) por SDS-PAGE.....	70

Figura 16. Cromatograma de la purificación de Trx-IL18.....	71
Figura 17. Cromatograma de la purificación de Trx-E2	71
Figura 18. Curva de calibración de BSA para cuantificación de Trx-IL18 y Trx-E2	72
Figura 19. Frotis correspondiente a la inducción con Trx-IL18, a 100X.....	73
Figura 20. Frotis correspondiente al control negativo a 100X.....	74
Figura 21. Frotis correspondiente al control positivo a 100X.	75
Figura 22. Viabilidad de células SiHa expuestas a Trx-E2	76
Figura 23. Ensayo de Apoptosis por Caspasa 3.....	77
Figura 24. ANOVA de E2 y Podofilotoxin.....	78
Figura 25. ANOVA del Control Negativo y Control Positivo.	79
Figura 26. ANOVA de Trx-E2 contra el Control Negativo.	79

Nomenclatura

°C	Grados Centígrados
μL	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATCC	Colección de Cultivos de Tipo americano
BL21(DE3)	Cepa de <i>Escherichia coli</i> para expresión de proteínas
bp	Pares de bases
Trx	Tioredoxina
Ni	Níquel
DH5α	Cepa de <i>Escherichia coli</i> carente de ADNasas
ADNasa	Enzimas que degradan el ADN
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
CaCu	Cáncer Cervicouterino
GST	Glutathione S-transferasa
CusF	Proteína Periplásmica
IMAC	Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
kDa	kilodaltones
LPS	Lipopolisacárido
mL	mililitro
M	Molar
MEM	Medio esencial mínimo
mM	milimolar
ng	nanogramos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

Rpm	revoluciones por minuto
WST-1	Sal de Tetrazolio
NK	células asesinas naturales
VPH	Virus de Papiloma Humano
HeLa	células cancerosas positivas a VPH18
SiHa	células cancerosas positivas a VPH16
LB	Medio de cultivo Luria Bertani

RESUMEN

QFB Jorge Solís Estrada

Fecha de Graduación: Enero 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: GENERACIÓN DE INTERLEUCINA 18 HUMANA Y PROTEÍNA REGULADORA E2 RECOMBINANTES Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA TERAPIA CONTRA EL CÁNCER.

**Número de Páginas: 103 Candidato para el grado de Maestría en Ciencias
con orientación en Farmacia**

Propósito y Método del Estudio: El cáncer es un crecimiento tisular resultado de la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, un ejemplo son los carcinomas como el cáncer cervicouterino (CaCu) que esta frecuentemente asociado a una infección con el VPH y que en México ocupa la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estima una ocurrencia de 13,960 casos en mujeres, con una incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres. La pérdida de funcionalidad de la proteína E2 que conforma a las proteínas tempranas del VPH confiere una desregulación de E6 y E7 las cuales son las responsables de la capacidad transformante de células infectadas. Las estrategias terapéuticas con las que se cuenta actualmente para tratar el cáncer, aún suelen ser invasivas, no selectivas y dolorosas; por lo que en estos últimos años la Inmunoterapia ha puesto de manifiesto el uso de algunos anticuerpos, factores de necrosis tumoral, y coticinas tal como la Interleucina 18 que juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune innata y adquirida. En este proyecto se estudió la citotoxicidad y la capacidad de la proteína E2 de inducir apoptosis en un cultivo celular SiHa (VPH16). Por otra parte, se evaluó la capacidad inmunomoduladora de IL-18 de estimular la diferenciación celular de monocito a macrófagos. Ambas proteínas obtenidas por técnicas de ADN recombinantes.

Contribuciones y Conclusiones: Se logró la obtención de las proteínas recombinantes fusionadas a Tiorredoxina. La proteína E2 mostró un efecto citotóxico e indujo apoptosis sobre la línea celular SiHA (VPH16), lo cual concuerda con estudios previos que indican que la reinserción de E2 provoca la muerte celular por apoptosis. Interleucina 18 demostró tener un efecto biológico sobre monocitos de sangre periférica como agente inmunomodulador. En este

trabajo, se aportan hallazgos importantes y que serán base fundamental para otros proyectos de investigación.

FIRMA DEL ASESOR: _____

Dr. Isaías Balderas Rentería

CAPÍTULO 1

1.- INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos representamos hábitats ideales en los que pueden crecer otros microorganismos, por lo que no debe sorprendernos que estemos sujetos a infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos. Hemos desarrollado mecanismos de defensa que nos permiten reconocer y destruir estos agentes infecciosos, por lo tanto, somos capaces de desarrollar inmunidad contra patógenos invasores¹. Dentro de estos mecanismos de defensa se encuentran las citocinas, que son un grupo de proteínas partícipes en la comunicación intercelular, secretadas por glóbulos blancos y otras células en el cuerpo en respuesta a diversos estímulos, ayudando a regular el desarrollo de células inmunitarias efectoras².

Interleucina 18 (IL18) es una citocina pro-inflamatoria que juega un papel importante en la respuesta inmune innata y adquirida. Originalmente fue descrita como un factor inductor de IFN- γ debido a los altos niveles de secreción por células asesinas naturales (NK) y células T³. Actúa promoviendo la citotoxicidad

de células NK y ha puesto de manifiesto su capacidad para inhibir el crecimiento y metástasis de células tumorales en diversos modelos de cáncer en ratones^{4, 5}.

IL-18 es secretada de forma constitutiva como un precursor inactivo (Pro-IL-18) por monocitos, macrófagos, keratinocitos, células epiteliales y células dendríticas. Agentes microbianos como Lipopolisacárido (LPS) y toxinas de bacterias gram positivas inducen la producción y secreción de esta citocina por medio de receptores Toll-like en macrófagos. El precursor Pro-IL-18 es escindido después del aminoácido Aspartato en la posición 35 por la proteasa IL-1 β (caspasa-1) para generar una forma biológicamente activa. Sin embargo, la caspasa-1 no es exclusiva en la escisión de Pro-IL-18 a su forma madura, reportes recientes indican que la proteinasa 3 puede generar la forma activa del precursor⁶.

La forma madura de IL-18 es regulada por una proteína de unión a IL-18 (IL-18BP), la cual neutraliza su actividad biológica, véase figura 1. La IL-18BP es específica y no se une al precursor, fue descubierta usando cromatografía de afinidad a ligandos que se había utilizado para aislar receptores solubles para otras citocinas incluyendo receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). La IL-18BP se ha considerado un blanco para algunos virus, un ejemplo claro es la oncoproteína E7 del VPH que incrementa la producción de la proteína de unión a IL-18 en keratinocitos con la finalidad de contrarrestar el efecto de IL-18 sobre el sistema inmunológico⁷.

Similar al receptor de IL-1, el receptor IL-18R es un heterodímero formado por una cadena α responsable de la unión extracelular de IL-18 y una cadena β

responsable de la traducción de señales al interior de la célula. Ambas cadenas son requeridas para la señalización de IL-18, véase figura 1. El IL-18R es expresado en una variedad de células incluyendo macrófagos, neutrófilos, células NK y endoteliales, y algunas células musculares⁸. Tras la unión de IL-18 a la cadena α , la cadena β es inducida a formar un complejo de alta afinidad para inducir vías de señalización compartidas con otros miembros de la familia de receptores IL-1. Esto implica el reclutamiento de la proteína de diferenciación mieloide 88 y la cinasa asociada a IL-1R (IRAK) al complejo receptor para su activación. De este modo, IL-18 comparte vías efectoras con moléculas reguladoras como los receptores Toll-like, los cuales están implicados en la regulación de la expresión de IL-18. Seguido de la activación, la auto fosforilación de IRAK permite la disociación del complejo del receptor, e interactúa con el factor asociado al receptor del adaptador de proteínas del factor de necrosis tumoral 6 (TRAF6). La activación del NF- κ B (factor transcripcional) depende de la fosforilación de su inhibidor I κ B por parte de TRAF6, la forma fosforilada es entonces marcada con ubiquitina para ser degradada por el proteasoma 26S. Libre el NF- κ B transloca del citosol al núcleo y se une a los elementos o sitios κ B de regiones reguladoras de genes participantes en la respuesta inmunitaria e inflamatoria⁹.

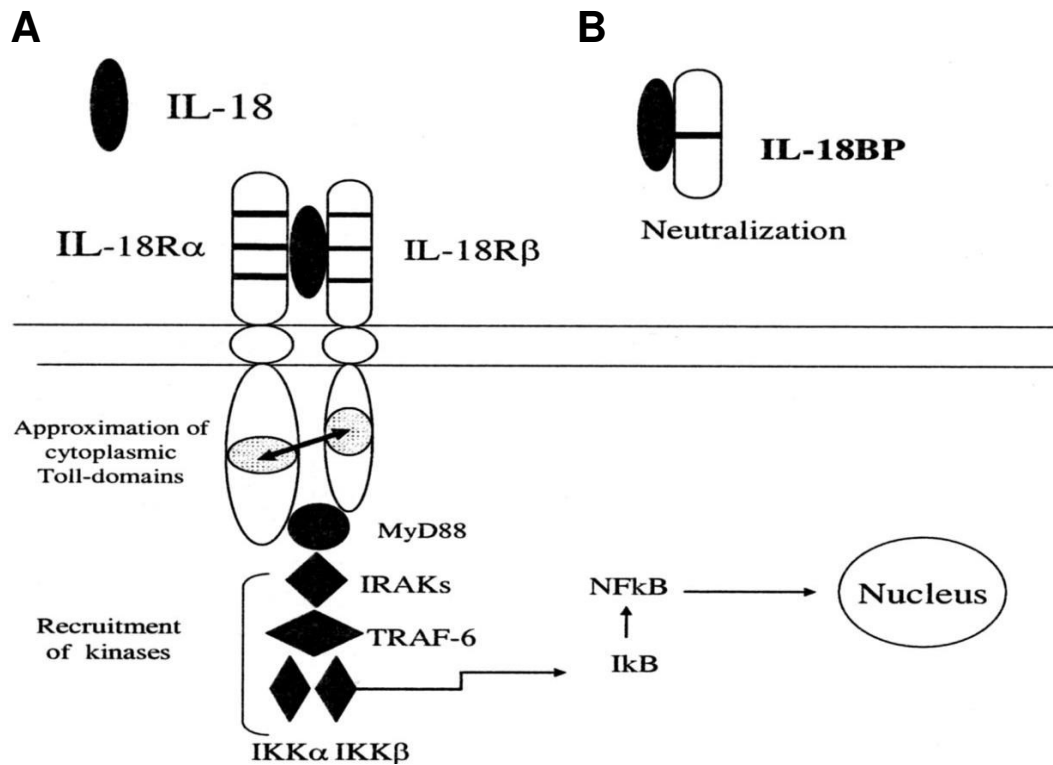


Figura 1. A) Señalización de Interleucina 18 por el complejo de receptor. B)

Unión de la ILBP a IL-18

Por otro lado, el cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal. Hay tres subtipos principales, el sarcoma que procede de tejido conectivo como huesos, cartílago, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. Las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de células sanguíneas, produciendo inflamación de ganglios linfáticos, invasión del bazo y medula ósea, y sobre producción de células blancas inmaduras. En el tercer subtipo se encuentran los

carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y de los tejidos glandulares de la mama y de la próstata¹⁰.

Dentro de los carcinomas, el cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa en México la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente se estima una ocurrencia de 13,960 casos en mujeres, con una incidencia de 23.3 casos por 100,000 mujeres. En el año 2013, en el grupo específico de mujeres de 25 años y más, se registraron 3,771 defunciones en mujeres con una tasa de 11.3 defunciones por 100,000 mujeres. Las entidades con mayor mortalidad por cáncer cervicouterino son Morelos (18.6), Chiapas (17.2) y Veracruz (16.4)¹¹.

El 99,8% de los casos de cáncer cervicouterino se deben a tipos específicos de un virus ADN tumoral transmitido por vía sexual, que se denomina virus del papiloma humano (VPH). Existen más de 100 tipos de virus del papiloma humano (VPH), alrededor de 40 tipos pueden infectar el área genital (la vulva, la vagina, el cuello uterino, el recto, el ano, el pene y el escroto) así como la boca y la garganta. Dos tipos de VPH (los tipos 6 y 11) causan la mayoría de los casos de verrugas genitales y al menos una docena de tipos de VPH pueden provocar cáncer, si bien dos en particular (los tipos 16 y 18) son los causantes de la mayoría de los casos. A estos se los denomina VPH de alto riesgo. La relación entre el CaCu y el VPH fue demostrado a principios de los años 80's por el doctor Harald zur Hausen y la infección es un requisito necesario para el desarrollo de la enfermedad¹².

El virus del papiloma humano pertenece a la familia *Papillomaviridae*, su genoma consiste de una molécula de ADN circular de doble cadena de aproximadamente 7904 bp (VPH-16). Está dividido en tres regiones, la región larga de control (LCR) que es una región no codificante, la segunda es una región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y una última región que corresponde a las proteínas tardías que conforman la cápside (L1 y L2)¹³, la figura 2 muestra la representación del genoma viral.

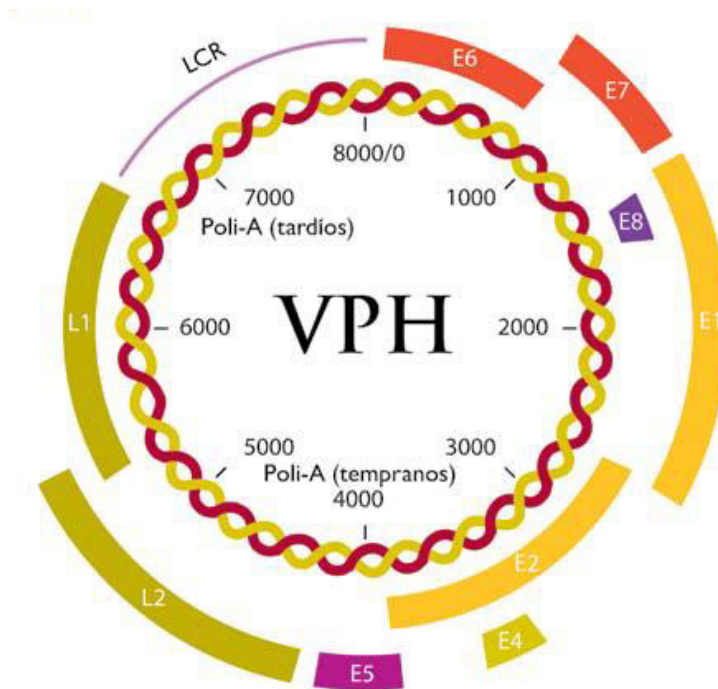


Figura 2. Estructura del genoma de VPH

Dentro de las proteínas tempranas, E1 es una helicasa hexamérica dependiente de ATP, que participa en la replicación del ADN viral. Se une al origen de replicación en una secuencia palindrómica de 18 pb rica en Adeninas y Timinas que se encuentra en la región larga de control (LCR). Esta unión

depende de su acomplejamiento con la proteína viral E2, la cual aumenta la especificidad de E1 por su secuencia, así como su capacidad para desenrollar la doble hélice¹⁴.

El producto génico de E2 es una proteína nuclear de 45 kDa, está dividida en tres dominios funcionales. El primero en el extremo amino terminal llamado dominio de activación (E2TAD) responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral. Promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al ADN en sitios distantes, provocando una curvatura en la molécula de ADN y otros cambios conformacionales. El segundo dominio es el de bisagra, el cual es variable entre los tipos de VPH. El tercer dominio en el extremo carboxilo terminal es de dimerización y de unión al ADN, de casi cien aminoácidos. E2 se une al palíndromo de aproximadamente 12 bp llamado sitio de unión de E2 (E2BS), que sufre un cambio conformacional al unirse a la proteína.

La unión de E2 al ADN provoca la represión o activación de dicho promotor y la replicación del ADN viral, estas funciones dependen a su vez de la concentración intracelular de E2. Se ha observado también que tiene una función anti proliferativa e induce apoptosis, mediante la represión de la transcripción de E6 y E7, así como el consecuente aumento de p53; la reintroducción de E2 en células SiHa provoca arresto en el ciclo celular durante la transformación maligna¹⁵.

La proteína E4 está contenida dentro del marco de lectura de E2. Su expresión procede de la síntesis de las proteínas estructurales del virus y el

ensamblaje de las partículas virales. La proteína E5 tiene como función principal sobre regular la actividad de los receptores de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento Epidermal (EGFR) o el del crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Por otra parte, E6 en VPH de alto riesgo tiene como papel principal inhibir la función de p53, una proteína supresora de tumores, mediante su degradación por la vía de la ubiquitina. También se ha demostrado que puede retener a P53 en el citoplasma bloqueando su traslocación al núcleo y así inhibiendo su función independientemente de su degradación. E7 tiene la mayor capacidad transformante y actúa mediante la unión a proteínas celulares supresoras de tumores de la familia pRB. La unión de E7 a la forma activa de pRB conduce a la liberación de los factores transcripcionales E2F independientemente de la presencia de factores de crecimiento externos, lo que promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la replicación celular. E7 también se asocia con otras proteínas tales como desacetilasas de histonas e inhibidores de los complementos CDK como p21 y p27¹³.

Las proteínas L1 y L2 que conforman la cápside viral, la cual está compuesta por 360 copias de L1 y aproximadamente de 12 copias de L2, organizados en 72 capsómeros de una partícula icosaédrica. La proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia pro-monocítica (PML) durante el ensamblaje del virus. Se ha sugerido que estos cuerpos PML son el sitio de la replicación del ADN viral, y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento¹⁶.

Estas últimas proteínas que conforman la cápside, han sido utilizadas como vacunas profilácticas, actualmente en el mercado se encuentran dos vacunas, Cervarix® que está indicada para VPH 16 y 18, compuesta por la proteína L1 que se presenta en forma de partículas no infecciosas similares al virus (VLPs) producidas por la tecnología del ADN recombinante mediante la utilización de un sistema de expresión en Baculovirus que utiliza células Hi-5 Rix4446 derivadas de *Trichoplusia ni*. La segunda vacuna llamada Gardasil®, indicada para VPH 6, 11, 16 y 18, compuesta por la proteína L1 en forma de partículas similares al virus producidas en células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* CANADE 3C-5 (Cepa 1895)) por tecnología del ADN recombinante. Ambas vacunas son de tipo preventivas, mas no curan el cáncer o la infección ya existente del virus.

La tecnología de ADN recombinante es una estrategia que facilita la obtención de moléculas con fines terapéuticos a partir de sistemas procarióticos o eucarióticos. *Escherichia coli* ha demostrado ser un sistema procariótico de elección para la producción de proteínas recombinantes heterólogas por su fácil manipulación genética y la gran cantidad de proteínas que puede expresar a escala. Por otro lado, se han desarrollado un gran número de vectores de clonación que mejoran aún más la expresión y purificación de proteínas de interés por técnicas cromatográficas, mediante proteínas de fusión como GST, His-Tag, Cusf, Tioredoxina, MBP, entre otras¹⁷.

CAPÍTULO 2

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Interleucina 18 como agente Inmunoterapéutico

La inmunoterapia del cáncer se ha usado extensamente en las últimas décadas para detectar y destruir células cancerígenas. Adyuvantes inmunológicos son esenciales para estimular la respuesta inmune más potente para una posible eliminación completa de células cancerosas. La Interleucina 18 (IL-18) es conocida también como factor inductor de Interferón- γ , es una citocina proinflamatoria de la familia de Interleucina 1 que ha demostrado un papel importante sobre células Natural Killer (NK), potenciando su citotoxicidad regulada por perforinas y la muerte celular dependiente de ligandos de FAS por células T colaboradoras 1 (Th1)¹⁸.

Rok Lee y cols¹⁹, generaron una proteína recombinante conformada por el factor estimulante de colonias granulocito macrófago (GM-CSF) e Interleucina 18. El GM-CSF es un importante factor de crecimiento hematopoyético y un inmunomodulador, promueve la proliferación de células T y activa las células

presentadoras de antígeno que conduce a la estimulación de crecimiento, maduración y diferenciación de células dendríticas²⁰. Para ello, el vector recombinante pCMV-GM-IL-18 se transfectó en células HEK-293A (células embrionarias de riñón) y la presencia de la proteína se detectó por Western Blott. Los ensayos *in-vitro* mostraron que la proteína GM-IL-18 sobre la línea celular de esplenocitos, es capaz de inducir la secreción de IFN- γ . La inducción del tumor fue por medio de la inyección de manera subcutánea de células CT26 (carcinoma) en un modelo *in-vivo* de ratones Balb/c y la tasa de crecimiento del tumor se controló hasta llegar a 0,5 cm² de tamaño para después ser inyectada la proteína GM-IL-18. Los ensayos histológicos y de inmunohistoquímica demostraron que los ratones inyectados tienen una baja frecuencia en la formación de tumores e inhibición en el crecimiento tumoral con respecto a los grupos control (PCMV-EGFP). Por lo tanto, se sugiere la proteína de fusión GM-IL-18 como una vacuna tumoral que pudiese ayudar a matar las células tumorales y un adyuvante para la inmunoterapia del cáncer.

Yang Jin y cols²¹, investigaron la capacidad de secreción de IFN- γ , IL-2 e IL-18 por la línea celular de cáncer pancreático BxPC-3 en respuesta al estímulo de cuatro mutantes de Interleucina 18 clonadas en el vector de expresión eucariótico pEGFP-C1, así como su distribución celular. La expresión y secreción de Interleucina 18 se ha demostrado en varios tipos de células del sistema inmune como los macrófagos, células T, neutrófilos, entre otras; induciendo la producción de IFN- γ por células T²². Así, la función crucial de IL-18 como una molécula inmunomoduladora es usada como antitumoral. Las cuatro mutantes

generadas fueron las siguientes: Mu0 corresponde al corte en el ATG del ORF de IL-18, asumiendo que IL-18 es cortada en el residuo de aminoácido 36 después de un residuo de aspartato conservado, se amplificó un cDNA que codifica un N-terminal Mu1. Para investigar la influencia con una secuencia incompleta de IL-18, el aminoácido 56 del N-terminal dio una forma truncada denominada Mu2, y el aminoácido 20 del C-terminal dio una forma truncada Mu3. Se retiraron aminoácidos que forman la parte central en la posición 124 y 143 para dar resultado a Mu4, este último sintetizado por la compañía TAKARA. Cada fragmento fue clonado en el vector pEGFP-C1. La proteína de fusión GFP-IL18 se observó por microscopía laser confocal.

Los resultados demostraron que las variaciones en la secuencia de ADN de IL-18 puede cambiar la distribución de sí misma *in-vitro*, pero no cambia la actividad con respecto a la secreción de IFN- γ e IL-18 en células BxPC3.

Un gran número de investigaciones indican que los tumores pueden escapar a la detección y eliminación inmunológica. Una baja regulación de la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, así como la activación de células o moléculas inmunosupresoras pueden disminuir la respuesta inmunológica a antígenos o pueden inducir la apoptosis de células inmunológicas efectoras²³. Las células NK y T de pacientes portadores de tumores exhiben anomalías en la transducción de señales que resulta en la pérdida de respuesta a apropiados estímulos de activación, algunas de estas señales defectuosas pueden ser revertidas por citocinas²⁴.

Interleucina 2 se caracteriza por ser una citocina que aumenta la producción de citocinas, mejora la actividad citolítica de células T y NK, así como demuestra tener efectos antitumorales. A pesar de que IL-2 ha sido aprobada para uso clínico, su utilidad general ha sido limitada por la aparición de una significativa toxicidad con un régimen de alta dosis, si la potencia antitumoral de IL-2 es incrementada por alguna vía, la dosis de IL-2 se verá reducida, así como la toxicidad relacionada²⁵. Por ello, IL-18 se mostró como un candidato idóneo al demostrar sus efectos inmunoregulatorios y potenciar marcadamente los efectos de IL-2 en varios aspectos de la función celular T y NK *in vitro*. Sugiriendo que la actividad sinérgica de estas dos citocinas pueden promover la activación, expansión y posiblemente la supervivencia de células efectoras que interactúan con tumores, mejorando así la respuesta antitumoral.

Por lo tanto, Du Guangying y cols²⁶, investigaron el efecto antitumoral de la fusión de Interleucina 2 e Interleucina 18 en un modelo de ratón. El gen de IL-18 no contiene algún péptido señal hidrofóbicos ni sitios de glicosilación, sus cuatro aminoácidos de cisteína no forman puentes disulfuro intermoleculares debido a su localización en el espacio; así, IL-18 es adecuada para ser expresada en sistemas de expresión procariota. IL-2 solo tiene un enlace disulfuro intermolecular pero no glicosilaciones. Debido a esto, se eligió un sistema de expresión procariótico *E. coli* BL21(DE3) y un vector de expresión pBV220 para la producción de la proteína de fusión. Los experimentos mostraron que la fusión génica IL18/IL2 podría ser altamente expresada en este sistema. Por otra parte, se demostró que la proteína de fusión mejora significativamente la producción de

IFN- γ por células Mononucleares de sangre periférica (PBMN) *in-vitro*, así como el aumento de la concentración en ratones portadores de tumores (carcinoma colorrectal y de pulmón), comparado con IL-18 e IL-2 nativas. En ambos modelos de ratón portadores de tumor, la citotoxicidad de células NK en grupos con IL18/IL2 fue mayormente observada que el grupo control. Estos resultados sugirieron que la actividad antitumoral de IL18/IL2 está relacionada con la habilidad de mejorar la citotoxicidad de células NK y la producción de IFN- γ , y por lo tanto exhiben un potencial prometedor en la inmunoterapia.

Lu Jianxin y cols²⁷, fusionaron el gen del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) e Interleucina 18, para posteriormente clonarlo en el vector pET-32 y expresar la proteína de fusión por el sistema procariótico *E. coli Rosetta (DE3)*, la proteína expresada se purificó por medio de cromatografía de afinidad al ion Níquel y fue detectada por Western Blot. El receptor del factor de crecimiento Epidermal (EGFR) es un miembro de la familia tirosina kinasa de receptores de factor de crecimiento. La unión del EGF con el EGFR podrían activar la proliferación celular, así como la diferenciación. EGFR es altamente expresado en muchos tipos de tumores humanos, la sobre expresión de este mismo ha sido reportada por participar en procesos carcinogénicos, tales como la proliferación celular, angiogénesis y metástasis. Debido a esto, se consideró idónea la fusión de EGF al péptido maduro de IL-18 humano para conocer la capacidad de unión a EGFR y conocer si dicha proteína mejoraría la actividad específica antitumoral de IL-18. Los resultados demostraron que EGF-IL18 exhibe un potencial prometedor en la inmunoterapia tumoral, especialmente en tumores sólidos con

sobre expresión de EGFR, al aumentar el porcentaje de células B y NK, así como la secreción de IFN- γ por macrófagos.

2.2.- E2 como proteína terapéutica

El sistema inmunológico es la primera barrera por la cual los virus han desarrollado diversas estrategias para evadir la respuesta inmunológica y poder pasar desapercibidas. Un ejemplo claro es la infección por el Virus de Papiloma Humano (VPH), la cual es considerada como el factor etiológico más importante del cáncer cervicouterino, y que ocupa el segundo lugar como la neoplasia más común en mujeres de América Latina, con 68,818 casos anuales¹¹.

El CaCu tiene una relación estrecha con la interleucina 18, principalmente con las oncoproteínas E6 y E7, las cuales han demostrado unirse e inactivar a IL-18 como una manera de evadir la respuesta inmunológica, así lo demostraron Lee Kyung²⁸ y cols, quienes por técnicas de ingeniería genética expresaron una mutante de IL-18 que contiene un recambio en un residuo de ácido glutámico a alanina en la posición 42 de acuerdo a investigaciones previas²⁹. Los resultados demostraron que la mutante IL-18 E42A indujo la secreción de IFN- γ por células Natural Killer en un mayor porcentaje en comparación con la IL-18 nativa, la unión de E6 y E7 se midió *in-vitro* mediante un contador gamma, por lo que se demostró que IL-18 E42A no es susceptible a la degradación por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16, lo que sugiere ser una citocina que podría ser usada en la inmunoterapia con pacientes de cáncer cervical.

Las oncoproteínas E6 y E7 se caracterizan por la unión a genes supresores de tumores como p53 y pRB, con la finalidad de evitar que la célula huésped muera por apoptosis³⁰. E2 regula a E6 y E7, sin embargo, la inserción del material genético del VPH a la célula hospedadora conlleva una disrupción del gen E2, por lo que E6 y E7 se encuentran desregulados como lo menciona Ramírez N³¹ y cols, al comprobar que la carcinogénesis viral requiere la integración del DNA dentro del DNA celular, este mecanismo conduce a una mayor expresión de oncoproteínas virales. La desaparición de E2 producida durante la integración coincidió con la expresión de E7.

Por otra parte, E2 y E7 pueden ser útiles como marcadores complementarios para estudios histopatológicos. E2 y E7 de VPH-16 podrían ser marcadores de etapas precursoras del cáncer cervical. En contraste, E2 tiene la capacidad de inducir apoptosis como lo describe Singh Nitu³² y cols, quienes determinaron las regiones de unión mínimas de los complejos E2 de VPH-18 con la procaspasa-8 y los residuos críticos que impulsan esta interacción. Además, la actividad pro-apoptótica de E2 muestra ser independiente de todas las funciones asociadas al virus. Se encontró que la oligomerización es un proceso que se induce por la interacción con E2, resultando en la activación de caspasas y, por tanto, la apoptosis.

Un blanco de E6 es p53, gen supresor de tumores que ha demostrado reprimir la replicación del DNA del VPH-11 (Virus de bajo riesgo carcinogénico) aunque el mecanismo aún no se ha determinado. Brown Craig³³ y cols, mostraron que en células HeLa transformadas por VPH por medio de la transfección del

vector pGL3-tk6E2, la apoptosis inducida por E2 se produce a través de la reimposición de control transcripcional en los oncogenes E6 y E7 de VPH. Sin embargo, en células no transformadas por VPH, la apoptosis inducida por E2 no requiere la capacidad de E2 para regular la transcripción, sino que requiere la capacidad de E2 para interactuar con p53.

CAPÍTULO 3

3.- JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad de múltiples facetas que comprende complejas interacciones entre las células neoplásicas y normales. Durante la última década, ha surgido un progreso considerable en la definición de las contribuciones moleculares, celulares y del medio ambiente a la fisiopatología del desarrollo de tumores, sin embargo, a pesar de estos avances, el tratamiento convencional de los pacientes todavía consiste generalmente en una cirugía, radioterapia y/o quimioterapia, y el resultado clínico para muchos de estos esfuerzos sigue siendo insatisfactorio. Por tal motivo, se considera necesario clonar, expresar y purificar una IL -18 humana recombinante que podamos evaluar para fines terapéuticos futuros. Por otro lado, el gen E2 del VPH ha mostrado ser un regulador de la expresión de las proteínas E6 y E7 del mismo virus, lo que pudiese considerarse como un factor minimizante del efecto cancerígeno de este virus, sin embargo, al ser a su vez retro inhibido por las oncoproteínas, se vuelve también un candidato para su administración como

coadyuvante en el tratamiento contra el cáncer cervicouterino. Consideramos que la administración exógena de esta proteína moduladora podría abatir la presencia de E6 y E7 inhibiendo o disminuyendo el efecto carcinogénico del VPH en pacientes infectados o con tumores ya establecidos.

CAPÍTULO 4

4.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1.- Hipótesis

- La proteína IL-18 Humana recombinante optimizada es capaz de modular la respuesta inmune en monocitos de sangre periférica.
- La proteína E2 de VPH16 recombinante es capaz de inducir un efecto regulador en células SiHa (VPH16).

4.2.- Objetivo General

Clonar, expresar y purificar las proteínas IL-18 humana optimizada, E2 del VPH en *E. coli* y evaluar su actividad biológica en células SiHa y monocitos *in vitro*.

4.3.- Objetivos Específicos

- Optimización del gen de IL-18 para el sistema de expresión
- Clonar, expresar y purificar la proteína E2 e IL-18
- Evaluar la actividad inmunomoduladora de IL-18 en monocitos de sangre periférica de pacientes sanos *in vitro*.
- Evaluar la actividad anticancerígena *in vitro* de la proteína E2 en células SiHa.

CAPÍTULO 5

5.- METODOLOGÍA

5.1.- Material y ubicación de equipos

Los equipos que se mencionarán a continuación se encuentran en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica, en el Laboratorio de Biotecnología 2 y Laboratorio de Biotecnología 3 de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Para la amplificación de los genes que codifican para las proteínas de interés se utilizó el Termociclador Corbett Research, modelo CG1-96. La electroforesis en gel de agarosa se visualizó por medio de un Transluminador marca UVP. Para los cultivos bacterianos se usó una incubadora Labnet, modelo 311DS. El pellet bacteriano se recolectó en una microcentrífuga marca “Thermo Scientific” y una ultracentrífuga Sorval Lynx de “Thermo Scientific”. La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo en una cámara marca “Life Technologies”, modelo Mini-V 8.10. Para la purificación de las proteínas se utilizó el cromatógrafo ÄKTA Primeplus,

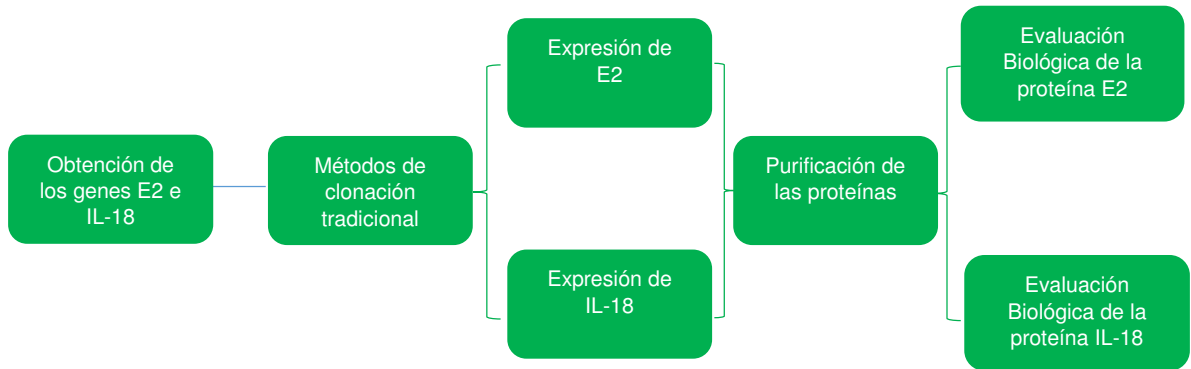
especializado en purificación de proteínas (FPLC), marca “General Electric”. Las muestras que requirieron refrigeración de 4° y -20°C fueron almacenadas en refrigeradores marca “TORREY”. Dentro del material empleado en el proyecto se utilizaron tubos Eppendorf de 1.5 mL y Axygen de 2 mL, Falcon de 15 y 50 mL y puntillas para micropipeta de 10µL, 200µL y 1000µL de la marca Corning. Matraces de 250 y 500 mL marca “Pyrex” y matraces triptinizados marca “Kimax”.

El plásmido usado para la clonación corresponde al vector pThioHis-B marca “Invitrogen”, posee un tamaño de 4.4 kb, un gen de resistencia a la ampicilina, una proteína de fusión Tiorredoxina, sitio de corte para Enteroquinasa y un sitio de clonación múltiple. Las enzimas de restricción empleadas fueron *Sal*I y *Kpn*I, ambas de la marca “Invitrogen”.

El gen correspondiente para Interleucina 18 (IL-18) fue sintetizado por la empresa “General Biosystems”. Los Oligonucleótidos para los genes que codifican para Interleucina 18 y E2 fueron sintetizados por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los reactivos para PCR corresponden a las marcas “New England BioLabs”, la enzima T4 ADN Ligasa es de la marca “Invitrogen”. Para la purificación de las proteínas, las columnas para cromatografía de afinidad HisTrap™FF corresponden a la marca “GE Healthcare”.

5.2.- METODOLOGÍA GENERAL

La metodología general del proyecto se representa en el siguiente esquema.



5.3.- OPTIMIZACIÓN DEL GEN INTERLEUCINA 18 HUMANA, E2 DE VPH 16 Y DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

5.3.1.- Optimización del gen Interleucina 18 humana

La secuencia a optimizar para el sistema de expresión del gen Interleucina 18 se obtuvo en la base de datos de GenBank del portal del NCBI, escribiendo la palabra "Homo sapiens Interleukin 18 mRNA" obteniendo la secuencia con clave *AY044641.1* correspondiente al mRNA de la Interleucina 18 humana. Se realizó un análisis computacional mediante el servidor *E. coli* Codon Usage Analyzer 2.1 del departamento de Biología de la Universidad de Riverside, EUA. Los codones con un porcentaje menor a 1 (indican la frecuencia de ese codón en el sistema bacteriano) fueron reemplazados manteniendo el mismo aminoácido para el cual codifica, con la finalidad de asegurar un 100% la traducción del gen.

Posteriormente a esta secuencia se le agregaron sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Sal I* y *Kpn I*, la síntesis del gen la realizó la empresa biotecnológica “General Biosystems”.

5.3.2.- Obtención del gen E2

Para la obtención de la secuencia del gen E2, se tecleó la palabra “Human Papillomavirus type 16 genes” y se obtuvo la secuencia con clave *LC027929.1* correspondiente al mRNA del gen E2 del VPH16. El gen se obtuvo de un plásmido artificial portador del genoma viral del VPH16, donado gentilmente por el Dr Hugo Barrera.

5.3.3.- Diseño de Oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos se realizó en base a la secuencia optimizada del gen IL-18 y E2, incluyendo los sitios de corte para las enzimas de restricción *Sal I* y *Kpn I*. Las secuencias fueron sometidas a análisis en un programa bioinformático OligoAnalyzer 3.1 provisto por la empresa “Integrated DNA Technologies”. Las características de los oligos mostraron tener longitudes de entre 19 y 25 nucleótidos, ser ricos en contenidos GC, tener complementariedad a las regiones deseadas, temperaturas de fusión similares y se evitó la formación de horquillas (*hairpins*) internas. Estos fueron sintetizados por la “Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología UNAM”.

5.4.- AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERES POR PCR

5.4.1.- Amplificación del gen IL-18 por PCR

Para la amplificación del gen IL-18, se preparó la mezcla de reacción en un micro tubo para PCR de 200 μ L agregando los reactivos y volúmenes indicados en la Tabla I. Los tubos se colocaron en el Termociclador, y se programó en las condiciones que se muestran en la Tabla II. Para la reacción se utilizó la enzima VENT ADN Polimerasa de “New England Biolabs”. Posterior a la amplificación se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la identidad de la amplificación.

Tabla I. Volumen de reactivos utilizados para la amplificación del gen IL-18 por PCR

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	38.5 μ L
Buffer 10X	5 μ L
dNTPs 2.5 mM	1 μ L
Primer Forward 50 pmol	1 μ L
Primer Reverso 50 pmol	1 μ L
ADN 10-250 ng	3 μ L
Enzima ADN Polimerasa 1000 U/mL	0.5 μ L

Tabla II. Condiciones de la amplificación del IL-18 por PCR

Tiempo	Temperatura (°C)	Ciclos
3 min	95	1
30 seg	95	30
30 seg	59	
30 seg	72	
5 min	72	1
5 min	4	1

5.4.2.- Amplificación del gen E2 por PCR

Para la obtención del gen E2, se preparó la mezcla de reacción en un micro tubo para PCR de 200 μ L agregando los reactivos y cantidades indicadas en la Tabla III. Los tubos se colocaron en el Termociclador, y se programó a las condiciones necesarias que se muestran en la Tabla IV. Para la reacción se utilizó la enzima VENT ADN Polimerasa de "New England Biolabs". Posterior a la amplificación se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la identidad de la amplificación.

Tabla III. Volumen de reactivos utilizados para la amplificación del gen E2 por

PCR

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	39.5 μ L
Buffer 10X	5 μ L
dNTPs 2.5 mM	1 μ L
Primer Forward 50 pmol	1 μ L
Primer Reverso 50 pmol	1 μ L
ADN 10-250 ng	2 μ L
Enzima ADN Polimerasa 1000 U/mL	0.5 μ L

Tabla IV. Condiciones de la amplificación del gen E2 por PCR

Tiempo	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Ciclos
3 min	95	1
45 seg	95	30
1 min	59	
1 min	72	
10 min	72	1
5 min	4	1

5.5.- CONSTRUCCIÓN DE LOS PLASMIDOS RECOMBINANTES pThioHis-B/IL-18 y pThioHis-B/E2

5.5.1.- Digestión del producto amplificado IL-18 con las enzimas de restricción *Sa*I y *Kpn*I

Confirmado el producto de amplificación por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, se procedió hacer la digestión primero con la enzima de restricción *Sa*I cuya mezcla de reacción se muestra en la Tabla V e incubándose durante 1 hora a 37°C. Terminada la incubación, se corrió un gel de agarosa al 1% del cual se extrajo la porción correspondiente al amplicón y se purificó con ayuda del kit comercial “GenScript”, concluida la purificación, el amplicón se digirió con la segunda enzima *Kpn*I, la Tabla VI muestra la mezcla de reacción y se incubó durante 1 hora a 37°C. El amplicón fue purificado de la misma manera arriba mencionada. Se procedió a la ligación con el vector de expresión.

Tabla V. Composición de la reacción de digestión del gen IL-18 con la enzima Sa I

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	5 µL
Buffer H 10X	4 µL
Inserto ≤ 1 µg	30 µL
Enzima <i>Sa</i> I 1000 U	1 µL

Tabla VI. Composición de la reacción de digestión del gen IL-18 con la enzima

Kpn I

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	5 μ L
Buffer L 10X	4 μ L
Inserto \leq 1 μ g	30 μ L
Enzima <i>Kpn I</i> 1000 U	1 μ L

5.5.2.- Digestión del producto amplificado E2 con las enzimas de restricción *Sal I* y *Kpn I*

Confirmado el producto de amplificación por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, se procedió a realizar la digestión primero con la enzima de restricción *Sal I* cuya mezcla de reacción se muestra en la Tabla VII e incubándose durante 1 hora a 37°C. Terminada la incubación, se corrió un gel de agarosa al 1% del cual se extrajo la porción correspondiente al amplicón y se purificó con ayuda del kit comercial "GenScript", concluida la purificación, el amplicón se digirió con la segunda enzima *Kpn I*, la Tabla VIII muestra la mezcla de reacción y se incubó durante 1 hora a 37°C. El amplicón fue purificado de la misma manera arriba mencionada. Se procedió a la ligación con el vector de expresión.

Tabla VII. Composición de la reacción de digestión del gen E2 con la enzima

Sal I

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	5 μ L
Buffer H 10X	4 μ L
Inserto \leq 1 μ g	30 μ L
Enzima <i>Sal</i> I 1000 U	1 μ L

Tabla VIII. Composición de la reacción de digestión del gen E2 con la enzima

Kpn I

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	5 μ L
Buffer L 10X	4 μ L
Inserto \leq 1 μ g	30 μ L
Enzima <i>Kpn</i> I 1000 U	1 μ L

5.5.3.- Digestión del plásmido pThioHis-B con las enzimas de restricción

Sal I y *Kpn* I

La reacción de digestión se llevó a cabo primero con la enzima *Sal* I, la mezcla de reacción se muestra en la Tabla IX e incubándose durante 1 hora a 37°C. Terminada la incubación, se corrió un gel de agarosa al 1% del cual se extrajo la porción correspondiente al plásmido y se purificó con ayuda del kit comercial “GenScript”, concluida la purificación, el plásmido se digirió con la segunda enzima *Kpn* I, la Tabla X muestra la mezcla de reacción que se incubó durante 1

hora a 37°C. El plásmido fue purificado de la misma manera arriba mencionada. Posteriormente se procedió a la ligación con los insertos.

Tabla IX. Composición de la reacción de digestión del plásmido pThioHis-B con la enzima Sal I

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	5 µL
Buffer H 10X	4 µL
Plásmido ≤ 1 µg	30 µL
Enzima <i>Sal I</i> 1000 U	1 µL

Tabla X. Composición de la reacción de digestión del plásmido pThioHis-B con la enzima Kpn I

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	5 µL
Buffer L 10X	4 µL
Plásmido ≤ 1 µg	30 µL
Enzima <i>Kpn I</i> 1000 U	1 µL

5.5.4.- Reacción de ligación del vector pThioHis-B con el inserto IL-18 y E2

El vector pThioHis-B y el inserto IL-18 previamente digeridos se ligaron en una reacción catalizada por la enzima T4 ADN Ligasa de “Invitrogen”, así como el vector pThioHis-B y el inserto E2. La reacción se preparó en un micro tubo de

200 μ l y los componentes se muestran en la Tabla XI manteniendo una relación molecular 1:3 del vector en relación al inserto e incubándose durante 1 hora a 25°C.

Tabla XI. Composición de las reacciones de ligación entre el plásmido *pThioHis-B* y el gen *IL-18*, *pThioHis-B* y el gen *E2*.

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	19 μ L
Buffer 5X	10 μ L
Vector 3-30 fmol	14 μ L
Inserto 9-90 fmol	6 μ L
Enzima T4 ADN Ligasa 5 U/ μ L	1 μ L

5.5.5.- Transformación bacteriana por células rubidio competentes con el vector recombinante

La transformación se llevó a cabo con células rubidio competentes de la cepa *E. coli* DH5 α . Para ello se hicieron dos transformaciones por separado, primero el vector recombinante *pThioHis-B/IL-18* y en un segundo ensayo el vector recombinante *pThioHis-B/E2*. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se tomaron 10 μ L del producto de ligación y se mezclaron con 20 μ L de células, se incubaron en hielo por 30 min y posteriormente se colocó el tubo en un baño de agua a 44°C por 45 segundos. Se pasó a hielo por 2 min y se le agregaron 800 μ L de caldo LB y se incubaron a 37°C con agitación (150 rpm) por 30 min. Después se

centrifugó por 2 min a 13300 rpm y se decantó el caldo LB dejando únicamente 50 μ L del mismo en el tubo. Posteriormente las células se resuspendieron y se sembraron en placa LB/Ampicilina (100 μ g/mL) por la técnica de extensión en placa, finalmente se incubaron a 37°C por 16 horas. Se aislaron las bacterias que crecieron en el medio LB con Ampicilina para su caracterización.

5.5.6.- Selección de clonas transformadas y extracción de ADN plasmídico

De la placa de LB/Ampicilina previamente sembrada se seleccionaron tres colonias y se inocularon en 6mL de caldo LB/Ampicilina (100 μ g/mL) e incubaron a 37°C por 16 horas y 200 rpm. Posteriormente se procedió a extraer el ADN plasmídico de la siguiente manera: se recolectaron las células en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 13300 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se le agregaron al pellet celular 300 μ L del reactivo TENS seguido de vórtex por 10 segundos, enseguida se adicionaron 150 μ L de Acetato de Sodio 3M y vórtex por 10 segundos. Los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 13300 rpm, recolectando en tubos nuevos la fracción soluble y agregándoles 900 μ L de etanol absoluto e incubando a -20°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron por 15 minutos a 13300 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se lavó con 500 μ L de etanol al 70% para eliminar el exceso de sales, se volvió a centrifugar por 3 minutos a 13300 rpm eliminando el sobrenadante y dejando secar por 5 minutos. Finalmente se disolvió el pellet celular resultante en 50 μ l de agua ultra pura.

5.5.7.- Confirmación de transformantes por PCR

Para confirmar que el gen IL-18 y E2 se encuentran ligados a la Tioredoxina dentro del plásmido pThioHis-B se procedió a hacer PCR usando el Primer Forward que flanquea el inicio del gen de Tioredoxina y el Primer Reverso que reconoce una secuencia al final del sitio de clonación múltiple donde debe estar insertado el gen IL-18 y por otra parte el gen E2. Utilizando el ADN plasmídico previamente extraído se realizó el análisis por PCR, en tubos de 200 μ l se preparó la mezcla de reacción que se muestra en la Tabla XII. Los tubos se colocaron en el Termociclador y se ingresaron las condiciones descritas en la Tabla XIII.

Tabla XII. Volumen de reactivos utilizados para la amplificación del gen IL-18 y E2 por PCR

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	35.5 μ L
Buffer 10X	5 μ L
MgCl ₂ 15mM	3 μ L
dNTPs 2.5 mM	1 μ L
Primer Forward Trx 50 pmol	1 μ L
Primer Reverso Trx 50 pmol	1 μ L
DNA 10-250 ng	3 μ L
Enzima ADN Polimerasa 5 U/ μ L	0.5 μ L

Tabla XIII. Condiciones de la amplificación del E2 por PCR

Tiempo	Temperatura (°C)	Ciclos
3 min	95	1
45 seg	95	35
1 min	59	
1.30 min	72	
10 min	72	1
5 min	4	1

5.5.8.- Subclonación bacteriana por células rubidio competentes con el vector recombinante.

Corroborada la construcción genética de los plásmidos recombinantes pThioHis-B/IL18 y pThioHis-B/E2 por técnicas de PCR usando el ADN plasmídico extraído de la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α , se procedió a subclonar la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pThioHis-B/IL18 y para el vector recombinante pThioHis-B/E2 se usó la cepa bacteriana *E. coli* Rosetta (DE3) plysS debido a que el gen E2 no fue optimizado, además, se mejora la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente usados en *E. coli*. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 20 μ l de células rubidio competentes más 1 μ l de 5 ng de ADN plasmídico, se incubaron 30 min en hielo y posteriormente se llevó a cabo el choque térmico a 44°C por 45 segundos, una vez finalizada la reacción se incubó en hielo por 2 min. Después se añadieron 800 μ l de caldo LB para la Subclonación de *E. coli* BL21 (DE3) y SOC para *E.*

coli Rosetta (DE3) plysS y se mezcló suavemente, la reacción se incubó a 37°C con agitación (150rpm) por 30 minutos. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13300 rpm por 2 min, se retiró el exceso de medio dejando aproximadamente 50µl del mismo en el cual se resuspendió la pastilla celular para posteriormente sembrarlas en placas de LB/Ampicilina y SOC/Ampicilina mediante la técnica de extensión por varilla, finalmente las placas se incubaron a 37°C por 16 horas.

5.6.- EXPRESIÓN PILOTO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La expresión piloto consiste en encontrar las condiciones óptimas donde la bacteria puede expresar las proteínas de interés. Para ello, se partió de tomar una clona recombinante de Trx-IL18 y Trx-E2 procedentes de *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* Rosetta (DE3) plysS, las cuales fueron inoculadas por separado en tubos Falcon de 15ml con 6ml de caldo LB/Ampicilina y SOC/Ampicilina (100 µg/mL) e incubándose a 37°C con agitación a 210rpm por 16 horas. Concluido este periodo, se tomaron 500 µl de los cultivos y se inocularon en tubos Falcon de 50 ml con 10 mL de caldo LB/Ampicilina y SOC/Ampicilina (100 µg/mL) e incubándose a 37°C con agitación a 210 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6, en este punto se añadió el inductor Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 2 mM continuando la incubación a 30°C y recolectando 2 mL de muestra a las 2, 4 y 6 horas. Una vez obtenidas las muestras, se centrifugaron a 13300 rpm durante 2 min y se descartó el medio, se les agregó 120 µL de agua ultrapura MQ y 40 µL de Buffer 4X para proteínas, se

mezcló y se llevó a hervir en baño maría durante 10 minutos. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 13300 rpm por 10 minutos. El sobrenadante que corresponde a la fase soluble se pasó a otro tubo limpio y el sedimento celular correspondiente a la fase insoluble se resuspendió en 100 μ L de Urea 8M. Ambas fases se almacenaron a -20°C para su posterior visualización por electroforesis en gel de poliacrilamida.

5.6.1.- Electroforesis en gel de Poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para la detección de las proteínas recombinantes.

Para la visualización de las proteínas recombinantes Trx-IL18 y Trx-E2 se corrió un gel SDS-PAGE al 12%. La composición del gel separador se muestra en la tabla XIV y la del gel concentrador en la tabla XV. Se procedió a armar los vidrios ("BioRad" 1.0mm y 0.75mm), primero se vació el gel separador y una vez polimerizado se vació el gel concentrador. El gel polimerizado se colocó en la cámara, la cual se llenó con Buffer TGS (250 mM Tris, 1.92M Glicina y 1% SDS, pH 8.3) y se procedió a cargar las muestras en los carriles, la electroforesis se corrió primero 30 minutos a 80 volts y 110 minutos a 100 volts. Posteriormente se procedió a teñir el gel con el colorante Azul de Coomasie.

Tabla XIV. Composición del gel separador al 12%

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	3.4 mL
30% Acrilamida/Bis	4.0 mL
Gel Buffer 1.5M Tris HCl pH 8.8	2.5 mL
10% w/v SDS	0.1 mL
Persulfato de Amonio 10%	50 μ L
TEMED	5 μ L

Tabla XV. Composición del gel concentrador al 4%

Componente	Volumen
Agua ultrapura MQ	6.1 mL
30% Acrilamida/Bis	1.3 mL
Gel Buffer 1.5M Tris HCl pH 8.8	2.5 mL
10% w/v SDS	0.1 mL
Persulfato de Amonio 10%	50 μ L
TEMED	10 μ L

5.6.2.- Escalamiento de la expresión de proteínas

Partiendo de las expresiones pilotos, se eligió la colonia que mejor expresión mostró de las proteínas de interés. La expresión se llevó a cabo usando matraces triptinizados de 500 mL hasta completar un volumen total de 2.5 litros. En un matraz triptinizado, se agregaron 250 mL de caldo LB/SOC respectivamente para cada cepa con 250 μ l de Ampicilina (100 μ g/ml) y se inocularon con un cultivo previamente crecido de la colonia seleccionada. Los matraces se incubaron a

37°C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600}) de 0.6, alcanzada la OD_{600} se comenzó la inducción con IPTG a una concentración de 2 mM a 30°C con agitación a 200 rpm durante 6 horas. El sedimento celular se recolectó en frascos de plástico de 500 mL utilizando una centrífuga refrigerada a 4°C, 8000 rpm por 15 minutos. Finalmente, los frascos con el sedimento celular se almacenaron a -20°C para su posterior análisis y purificación.

5.6.3.- Lisis celular y obtención de clarificados

El sedimento celular obtenido del escalamiento de expresión fue resuspendido en 20 mL de Buffer de Unión (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8) y lisado utilizando una cámara con perlas de vidrio en un baño frío. El lisado obtenido fue centrifugado a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El clarificado se separó para su posterior purificación por cromatografía de afinidad.

5.7.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

5.7.1.- Cromatografía de Afinidad para las proteínas recombinantes Trx-IL18 y Trx-E2

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad usando columnas HisTrap FF 1 mL de la marca “GE Healthcare Life Science”, las cuales están pre empacadas con ion Níquel lo que ayudará, por medio de la proteína de fusión

Tioredoxina (Trx) que tiene afinidad al ion Níquel, a purificar las proteínas de interés. Para ello se prepararon tres soluciones, cuyas composiciones se describen en la tabla XVI.

Tabla XVI. Composición de las soluciones para cromatografía de afinidad

Solución amortiguadora de unión pH 8	
Componente	Concentración
Tris Base	50 mM
NaCl	500 mM
Solución amortiguadora de lavado pH 8	
Tris Base	50 mM
NaCl	500mM
Imidazol	5mM
Solución amortiguadora de elución pH 8	
Tris Base	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	250 mM

El proceso de purificación se llevó a cabo por medio del sistema de cromatografía líquida ÄKTA Prime Plus de “GE Health Care”. Como primer paso se equilibró la columna con 5 volúmenes de solución amortiguadora de unión para posteriormente cargar la muestra a la columna. Una vez inyectada la muestra a la columna, el valor de absorbancia tendió a bajar hasta hacerse constante

usando la solución amortiguadora de lavado. Por consiguiente, se procedió a eluir la proteína con la solución amortiguadora de elución. Se recolectaron fracciones de 500 μ l donde se observó un incremento de la absorbancia en el cromatograma, para posteriormente analizarlas por SDS-PAGE y corroborar la presencia y pureza de dichas proteínas recombinantes.

5.7.2.- Diafiltración para la remoción de Imidazol y Cloruro de Sodio

Las fracciones donde se encontraron las proteínas de interés fueron mezcladas y se llevó a cabo la diafiltración para eliminar el exceso de Imidazol y cloruro de sodio. Estas fracciones se colocaron en un filtro Ámicon® (10KMWCO) y posteriormente se centrifugaron a 4500 xg durante 30 minutos a 4°C. Se descartó el líquido del tubo colector, se agregaron 4 mL de una solución amortiguadora de Tris 50 mM pH 8 a 4°C en el repositorio y se centrifugó bajo las mismas condiciones, este paso se repitió por tres veces, obteniendo un volumen final en el repositorio de 250 μ L, el cual se resuspendió y colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL.

5.7.3.- Determinación de la concentración de proteínas

La cuantificación de proteínas totales se determinó por el método Bradford. Se realizó una curva de calibración para determinar la concentración de las muestras a analizar utilizando una solución de 1.37 mg/mL de Albumina de Suero Bovino como estándar de proteína. Se llevaron a cabo diluciones del estándar para

obtener concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL, posteriormente se pipetearon 10 μ L de cada una de ellas en una placa de 96 pocillos, dejando una fila de pocillos vacía, se procedió a cargar 10 μ L de cada muestra a analizar en pocillos separados para posteriormente agregar 200 μ L del reactivo Bradford cuya composición se muestra en la tabla XVII, para las muestras y el estándar. La lectura de la placa se llevó a cabo en un lector de la marca “Thermo Scientific”, para lo cual se ingresó el programa con un tiempo de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente y una lectura de absorbancia de 595 nm, tanto los ensayos de la muestra como los de la curva de calibración se llevaron a cabo por triplicado.

Tabla XVII. Composición del reactivo Bradford 5X

Compuesto	Concentración
Azul de Coomasie G-250	100 mg
Etanol 95%	50 mL
Ácido Fosfórico concentrado	100 mL
Agua ultrapura MQ	Aforar a 200 mL
Disolver y filtrar, preparar una solución de trabajo 1X	

5.8.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE IL-18 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES SANOS *in-vitro*.

La actividad inmunomoduladora de IL-18 se evaluó mediante la maduración de monocitos a macrófagos en una muestra de sangre periférica en respuesta al estímulo generado por IL-18 fusionado a Tioredoxina y su observación mediante la Tinción de Wright la cual da una coloración púrpura a los núcleos de los leucocitos y a los gránulos neutrofílicos, y un color rosado a los eritrocitos. Los componentes de este efecto son el Azul de Metileno y la Eosina.

5.8.1.- Extracción de sangre periférica

La extracción de sangre se hizo por punción venosa en la cara anterior del antebrazo. El sitio de punción se limpió con ayuda de una torunda y etanol al 96%. Posteriormente, se colocó una banda elástica alrededor del antebrazo con la finalidad de ejercer presión al restringir el flujo de sangre a través de la vena. Se introdujo una aguja en la vena y se recolectó la muestra de sangre en tubos BD Vacutainer con EDTA, mientras se tomaba la muestra se retiró la banda elástica para restablecer el flujo sanguíneo. Al término de la toma de muestra, se retiró la aguja y se limpió el sitio de punción.

5.8.2.- Exposición de sangre periférica a IL18

Se usaron tres tubos de ensayo con tapa y se colocaron 2 mL de sangre periférica a cada uno, y se agregó una concentración de 14 ng/mL de la proteína Trx-IL18, Posteriormente se incubaron por 24 hrs a 37°C con agitación constante. El ensayo se comparó con un cultivo sin proteína Trx-IL18 como control negativo y un cultivo inducido con Lipopolisacárido (LPS) a una concentración de 10 µg/mL como un control positivo.

5.8.3.- Evaluación microscópica

Se realizaron frotis de las muestras de sangre periférica antes y después de la inducción con Trx-IL18, y se tiñeron por la tinción de Wright para observar el patrón de diferenciación celular. Se colocó una gota de sangre periférica en un portaobjetos y se hizo un extendido delgado que se secó al aire. Estos extendidos fueron fijados con metanol absoluto durante 3 min y se lavaron con agua ultrapura miliQ. Posteriormente, se cubrieron los portaobjetos por completo con el colorante Wright por un tiempo de 5 min, se enjuagó con agua miliQ para eliminar exceso de colorante. Se limpió la parte posterior del portaobjetos y se dejó secar, se cubrió el extendido con un cubreobjetos asegurándose que quedara en la posición correcta. Los frotis se observaron al microscopio y fueron comparados con los controles.

5.9.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *in-vitro* DE LA PROTEÍNA E2 EN CELULAS SIHA.

La actividad anticancerígena de la proteína E2 fusionada a Tioredoxina se evaluó en un cultivo de células SiHa (ATCC® HTB-35™) para determinar si la proteína es capaz de inducir la muerte celular por medio del ensayo de WST-1 y, por otra parte, el ensayo de Caspasa 3 nos permitió conocer si las células mueren específicamente por apoptosis.

5.9.1.- Ensayo con WST-1

Se tomó un cultivo de células SiHa (ATCC® HTB-35™) al 80% de confluencia, estas células fueron despegadas de la caja por la adición de 0.5 mL de una solución de Tripsina al 0.25% y su posterior incubación de 5 min a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, las células fueron recuperadas y se centrifugaron durante 8 min a 1000 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 mL de medio MEM y se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer; finalizando el conteo celular, se realizó el ensayo en una placa de 96 pocillos colocando 5000 células en 100 µL por pozo. Se incubó la placa durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Concluido este periodo, se añadieron 100 µL con la proteína Trx-E2 a la concentración deseada. Posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37°C y una atmósfera al 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación se reemplazó el medio con 100

μL de medio de cultivo MEM fresco y después se añadió 10 μL del reactivo de WST-1 [2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio] y se incubaron por 2 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO_2 y finalmente se midió la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas modelo ELx800 marca "BIOTEK". Como control positivo se utilizó tritón al 1%, las células sin tratamiento como control negativo y como blanco el medio MEM y WST-1.

Las concentraciones de la proteína Trx-E2 que se utilizaron fueron de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las diluciones fueron preparadas con medio de cultivo MEM. Todas las muestras fueron realizadas por triplicado.

5.9.2.- Ensayo por Caspasa 3

Un cultivo de células SiHa (ATCC® HTB-35™) al 85% de confluencia fueron despegadas de la caja por la adición de 0.5 mL de una solución de Tripsina al 0.25% y su posterior incubación de 5 min a 37°C en una atmósfera al 5% de CO_2 , las células fueron recuperadas y se centrifugaron durante 8 min a 1000 rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 mL de medio MEM y se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer; se usaron 1,000,000 células por mL y se expusieron a las concentraciones deseadas de la proteína Trx-E2. El control positivo fue Podofilotoxina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y como control negativo fueron usadas células sin tratamiento. El cultivo fue incubado por 24 horas a 37 °C en atmósfera al 5% de CO_2 . Las células fueron despegadas y resuspendidas de la placa de cultivo mediante tratamiento con

tripsina, se hicieron tres lavados con 1 ml de Buffer de Fosfatos Salinos (PBS) para después centrifugarlas y retirar el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 50 μ L de buffer de lisis 1X (200 mM TRIS, pH 7.5, 2 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2% TRITON™X-100) a las células y se incubaron en hielo por 30 min para después centrifugar la muestra a 5000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo de 1.5 ml y se determinó la cantidad de proteína presente en cada muestra usando el método de Bradford. Se usaron 4 μ g de proteína en un volumen total de 50 μ L de la muestra por pocillo en una microplaca de 96 pocillos. Fueron agregados 50 μ L del buffer de trabajo 2X (10 μ L de 5 mM Z-DEVD-R110 en 990 μ L de buffer de reacción 2X) a cada muestra y control negativo, se usó un pocillo como blanco el cual contenía 50 μ L de buffer de lisis 1X y 50 μ L de buffer de trabajo 2X; se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron las lecturas de fluorescencia (excitación/emisión 496/520 nm) en un Fluorómetro marca “Thermo Fisher”.

5.9.3.- Análisis Estadístico

Mediante Análisis de Varianza se permitió conocer el valor de p y el nivel de significancia, por lo tanto, se concluirá que al menos una media de las muestras a evaluar es diferente, por lo contrario, todas son iguales.

5.10.- Manejo de los residuos de laboratorio

Los residuos químicos y biológicos se dispusieron en diversos contenedores de acuerdo a lo siguiente:

- A: Soluciones salinas pH 6.8: sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, orgánicos y bases inorgánicas.
- D: Tóxicos inflamables, combinaciones orgánicas halogenadas líquidas, bases orgánicas y aminas.
- E: Muy tóxico, cancerígeno orgánico.
- Contenedor rojo: Residuos punzocortantes biológico-infeccioso.
- Contenedor amarillo: Residuos de órganos, tejidos, célula biológico-infecciosa.

Estos se encuentran estratégicamente ubicados en el laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica. El material biológico fue esterilizado mediante calor húmedo.

CAPÍTULO 6

6.- RESULTADOS

6.1.- Optimización del gen Interleucina 18 humana

El gen de Interleucina 18 se obtuvo en la base de datos del GenBank del portal NCBI, la búsqueda arrojó una secuencia de 582 bp que se muestra en la figura 3.

```
ATGGCAGCAGAGCCAGTAGAGGACAATTGCATCAATTTTCGTCGCCATGAAATTTATCGATAA
CACGCTGTATTTTCATTGCGGAAGATGATGAAAACCTTAGAATCAGATTACTTTGGCAAACCTTGC
ATCCAAGCTGAGTGTTCATTGCAATCTGAATGACCAGGTGTTATTTATCGATCAAGGAAATC
GCCCCGCTATTCGAGGATATGACGGACAGCGATTGCAGAGATAACGCTCCCAGGACAATTTT
TATTATATCTATGTATAAAGATAGTCAACCTCGTGGTATGGCTGTTACTATTAGTGTGAAATG
TGAGAAGATATCTACACTTTCCTGTGAAAATAAAATTATTTCTTCAAAGAAATGAATCCCCCT
GATAACATAAAAAGACACTAAAAGCGATATTATTTCTTCCAACGTTCTGTTCCGGGACATGAT
AACAAAATGCAGTTTGAATCGAGCTCGTATGAAGGTTATTTCTGGCGTGCGAAAAAGAACG
CGATCTGTTTAAATTGATCCTGAAGAAGGAAGATGAACTCGGCGACCGTAGCATAATGTTTA
CCGTACAGAACGAGGACTAA
```

Figura 3. Secuencia de nucleótidos del gen Interleucina 18 con un tamaño de

582 bp

En la figura 4 se muestra el análisis del gen IL-18 nativo mediante el servidor *E. coli* Codon Usage Analyzer 2.1. Se obtuvo un total del 20% (43 de 193 aminoácidos) de codones que se encuentran por debajo de un 10% de frecuencia (Barras en color rojo). Las barras en color verde indican una mayor frecuencia.

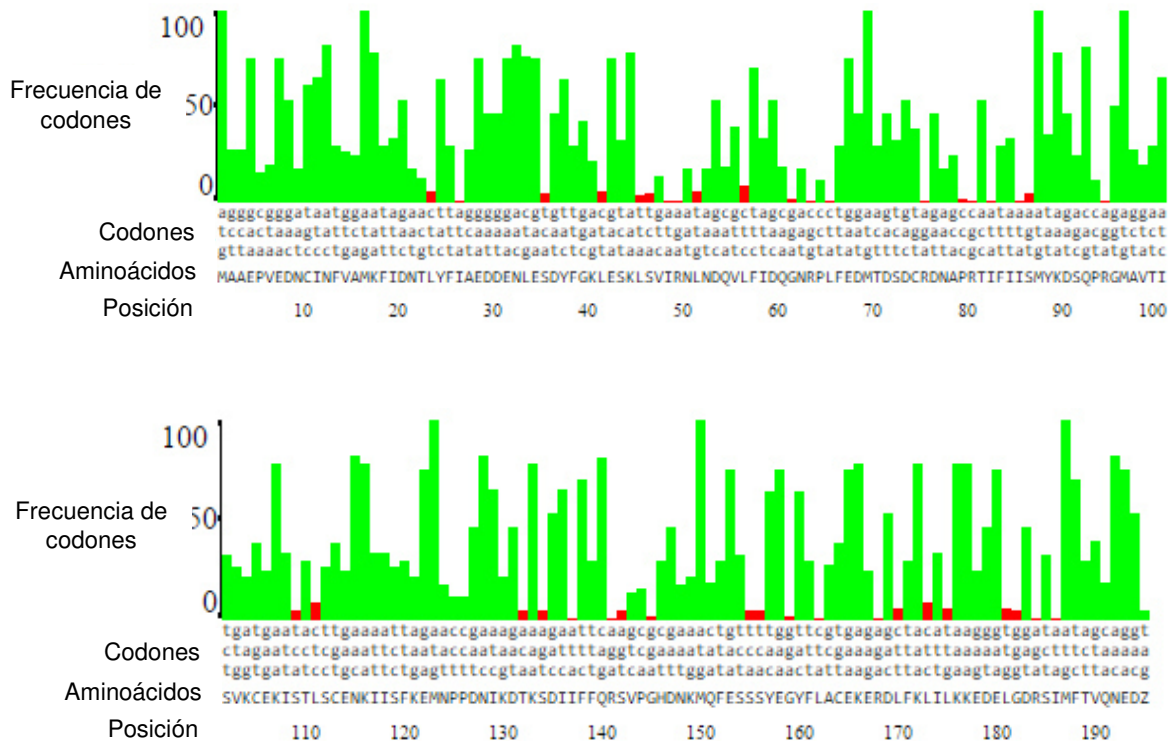


Figura 4. Gráficos del análisis del gen IL-18 nativo y la frecuencia de los codones para el sistema procariontario E. coli. Se representan los codones y el aminoácido para el cual codifican, así como la posición.

Posteriormente los codones que se encontraron por debajo del 10% de frecuencia fueron reemplazados sin alterar el aminoácido para el cual codifican. La figura 5 muestra el análisis del cual se obtuvo una secuencia optimizada con

un porcentaje mayor al 10%, lo cual asegura la completa traducción de estos codones por el sistema de expresión procarionótico *E. coli*.

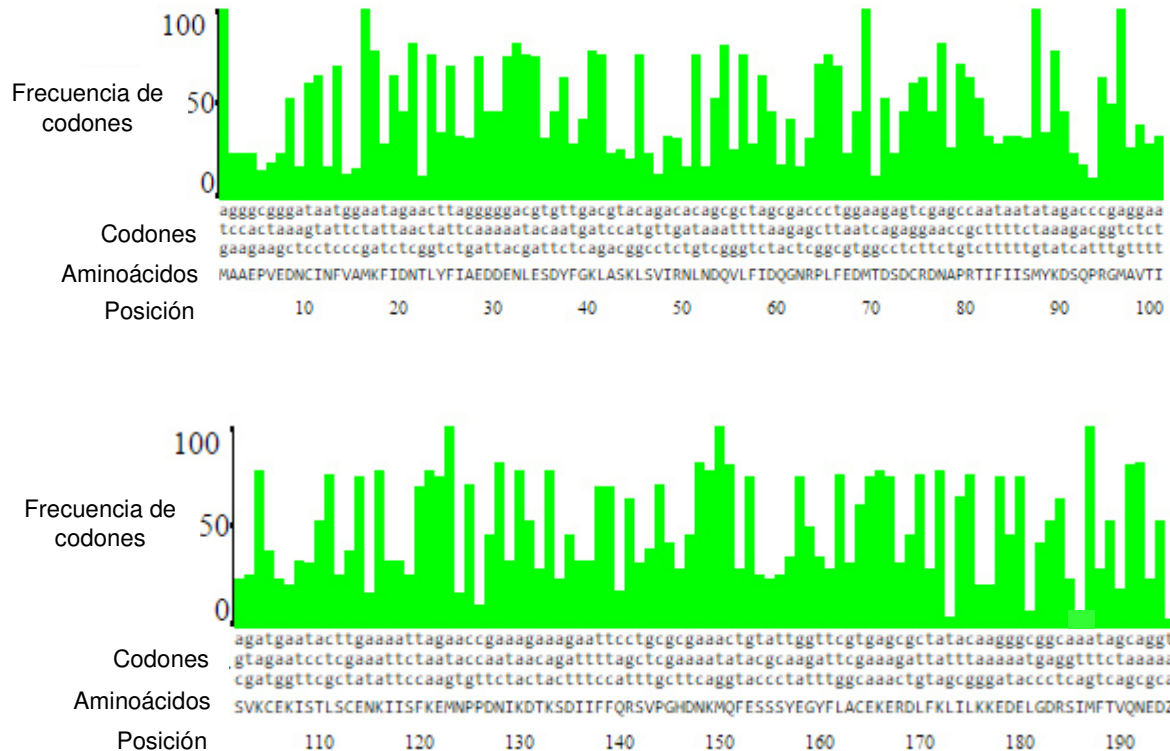


Figura 5. Gráficos del análisis del gen IL-18 optimizado

6.2.- Obtención del gen E2

Mediante la búsqueda en la base de datos del GenBank en el portal NCBI, se obtuvo la secuencia del gen E2 que consta de un tamaño de 1098 bp. La figura 6 corresponde a la secuencia de nucleótidos de dicho gen.

```

ATGGAGACTCTTTGCCAACGTTTAAATGTGTGTCAGGACAAAATACTAACACATTATGAAAA
TGATAGTACAGACCTACGTGACCATATAGACTATTGGAAACACATGCGCCTAGAATGTGCT
ATTTATTACAAGGCCAGAGAAATGGGATTTAAACATATTAACCACCAGGTGGTGCCAACT
GGCTGTATCAAAGAATAAAGCATTACAAGCAATTGAACTGCAACTAACGTTAGAAACAATAT
ATAACTCACAATATAGTAATGAAAAGTGGACATTACAAGACGTTAGCCTTGAAGTGTATTTA
ACTACCCAACAGGATGTATAAAAAAATGATGATATACAGTGGAAAGTGCAGTTTGTGGAG
ACATATGCAATACAATGCATTATACAACTGGAAACATATATATTTTGTGAAGAAGCATCAG
TAACTGTGGTAGAGGGTCAAGTTGACTATTATGGTTTATATTATGTTTCATGAAGGAATACGA
ACATATTTTGTGCAGTTTAAAGATGATGCAGAAAAATATAGTAAAAATAAAGTATGGGAAGTT
  
```

CATGCGGGTGGTCAGGTAATATTATGTCCTACATCTGTGTTTAGCAGCAACGAAGTATCCT
 CTCCTGAAACTATTAGGCAGCACTTGGCCAACCACTCCGCCGCGACCCATACCAAAGCCG
 TCGCCTTGGGCACCGAAGAAACACAGACGACTATCCAGCGACCAAGATCAGAGCCAGACA
 CCGGAAACCCCTGCCACCACTAAGTTGTTGCACAGAGACTCAGTGGACAGTGCTCCAAT
 CCTCACTGCATTTAACAGCTCACACAAAGGACGGATTAAGTGTAAATAGTAACACTACACCCA
 TAGTACATTTAAAAGGTGATGCTAATACTTTAAAATGTTTAAAGATATAGATTTAAAAGCATT
 GTAAATTGTATACTGCAGTGTCTGCTACATGGCATTGGACAGGACATAATGTAAAACATAAA
 AGTGCAATTGTTACACTTACATATGATAGTGAATGGCAACGTGACCAATTTTTGTCTCAAGT
 TAAAATACCAAAAACACTATTACAGTGTCTACTGGATTTATGTCTATATGA

Figura 6. Secuencia de Nucleótidos del gen E2 con un tamaño de 1098 bp

6.2.- Diseño de oligonucleótidos

Se presenta a continuación las secuencias de los Oligonucleótidos (Primers) diseñados para el gen Interleucina 18 y E2, estos se presentan en dirección 5´-3´, incluyendo los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Kpn I* (GGTACC) y *Sal I* (GTCGAC) en itálicas y negritas, véase tabla XVIII.

Tabla XVIII. Diseño de Oligonucleótidos para el gen Interleucina 18 y E2

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Enzima de Restricción
IL-18	Forward	CT GGTACC CATGGCAGCAGAG	<i>Kpn I</i>
	Reverse	CC GTCGACT TAGTCCTCGTTCTGTAC	<i>Sal I</i>
E2	Forward	T AGGTACC CATGGAGACTCTTTGC	<i>Kpn I</i>
	Reverse	GG GTCGACT CATATAGACATAAATCCAGTAG	<i>Sal I</i>

6.3.- AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS POR PCR

6.3.1.- Amplificación del gen IL-18 por PCR

En la figura 7 se presenta un gel de agarosa al 1% que muestra la amplificación del gen IL-18 con un tamaño de 595 nucleótidos, a partir del ADN optimizado para el sistema de expresión procariótico.

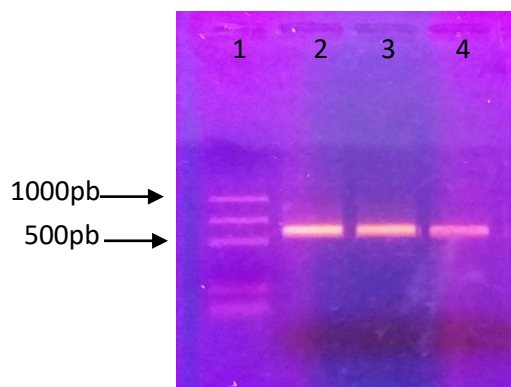


Figura 7. Gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen IL-18 (595 pb). Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-4: Amplicón del gen IL-18 por PCR

6.3.2.- Amplificación del gen E2 por PCR

En la figura 8 se presenta un gel de agarosa al 1% que muestra la amplificación del gen E2 con un tamaño de 1098 nucleótidos, a partir de una muestra de ADN plasmídico con que se cuenta en el laboratorio.

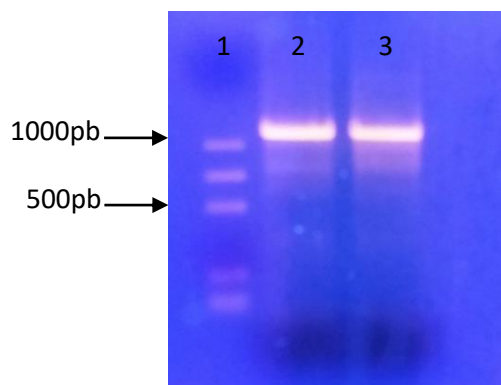


Figura 8. Gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen E2 (1098 pb). Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2-3: Amplicón del gen E2 por PCR.

6.4.- CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES pThioHis-B/IL-18 y pThioHis-B/E2

6.4.1.- Digestión de los genes IL-18, E2 y el plásmido pThioHis-B con las enzimas de restricción *Kpn I* y *Sal I*

Los productos amplificados del gen IL-18 y E2 por PCR, así como el ADN plasmídico pThioHis-B fueron digeridos con sus respectivas enzimas de restricción de acuerdo con los apartados 4.5.1-3. En la figura 9 se muestra una representación gráfica de la digestión de los genes y el plásmido con la enzima *Kpn I* y *Sal I*.

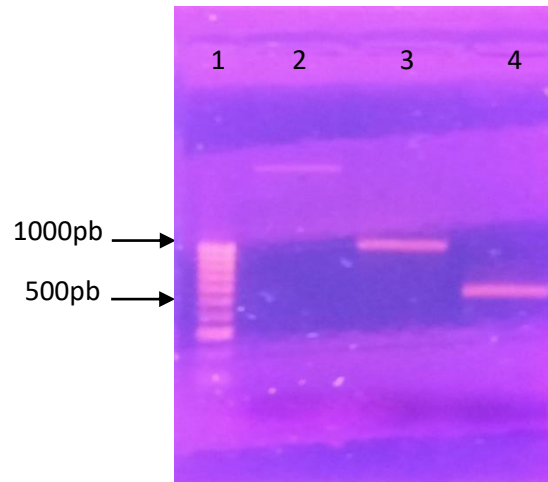


Figura 9. Gel de agarosa al 1%. Digestión del gen IL-18, E2 y el plásmido pThioHis-B con las enzimas de restricción Kpn I y Sal I. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: Digestión del plásmido pThioHis-B. Carril 3: Digestión del gen E2. Carril 4: Digestión del gen IL-18

6.4.2.- Reacción de ligación del vector pThioHis-B con el inserto IL-18 y E2

La reacción de ligación entre el plásmido pThioHis-B con cada uno de los insertos IL-18 y E2, estuvo catalizada por la enzima T4 ADN Ligasa, se mantuvo una relación molecular 3:1 del gen con respecto al vector. En la Figura 10 se muestra una representación gráfica de las ligaciones, posterior a la ligación, se procedió a la transformación bacteriana.

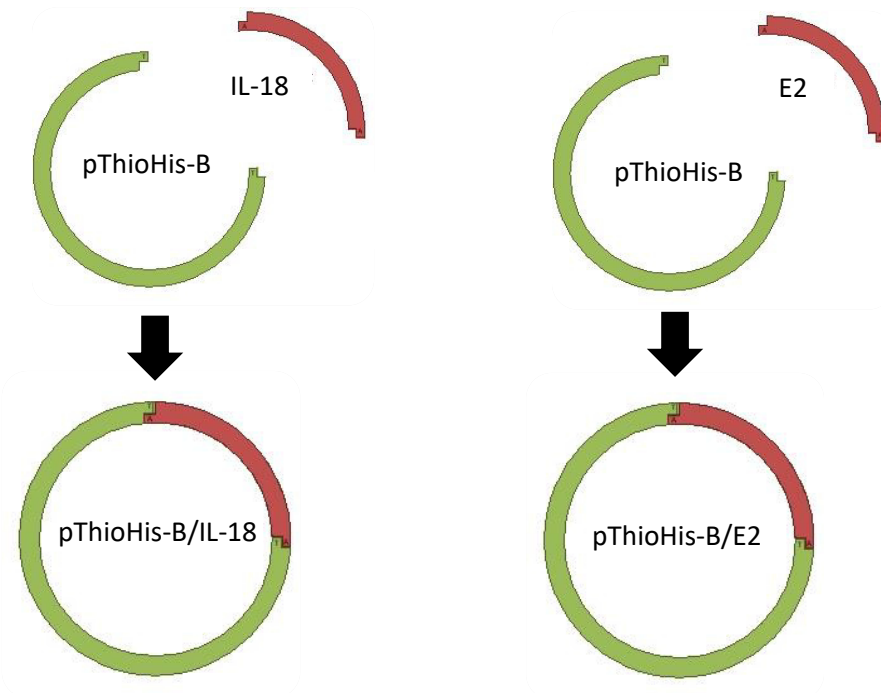


Figura 10. Esquema general de clonación para IL-18 y E2

6.4.3.- Selección de clonas transformadas y extracción de ADN plasmídico

Después de la transformación de la cepa *E. coli* DH5 α con los productos de ligación, se procedió a levantar tres colonias para cada una de las clonaciones del gen IL-18 y E2, se inocularon en 5 mL de LB/Ampicilina (100 μ g/mL) y se procedió a caracterizar las clonas para observar el tamaño de los plásmidos. Para ello se realizó extracción de ADN plasmídico y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar si los plásmidos contenían los genes de IL-18 y E2.

6.4.4.- Confirmación de transformantes por PCR

A partir de la extracción de ADN plasmídico anterior, se procedió hacer una PCR para corroborar que los genes se encuentren ligados a Tiorredoxina en el plásmido. En la Figura 11 se muestra un gel de agarosa al 1%, en el primer carril se encuentra un marcador de peso molecular, del carril 2 al 4 los amplicones del gen E2, y del carril 5 al 7 se encuentran los amplicones del gen Interleucina 18.

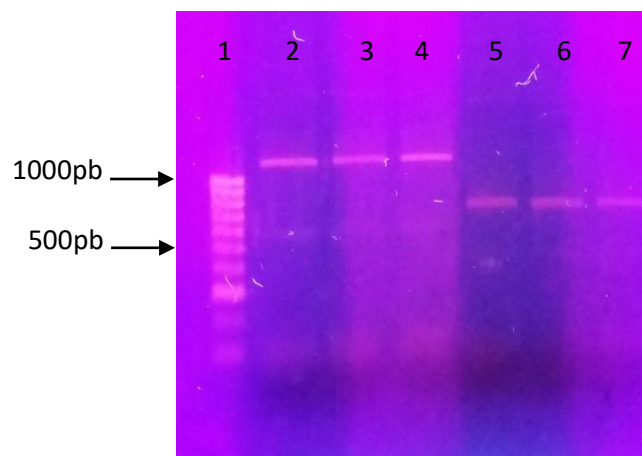


Figura 11. Confirmación de transformantes por PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2-4: Amplicones del gen E2. Carril 5-7: Amplicones del gen IL-

18

6.5.- EXPRESIÓN PILOTO DE PROTEINAS RECOMBINANTES

Una vez que se confirmó la construcción de pThioHis-B/IL-18 y pThioHis-B/E2 se subclonó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* Rosetta (DE3) plysS respectivamente para la expresión de las proteínas, se inocularon 10 mL de medio LB/Ampicilina (100 μ g/mL) y SOC/Ampicilina (100 μ g/mL), y se analizó por

SDS-PAGE al 12% (IL-18) y 8% (E2). En la Figura 12 se observó la expresión de Trx-IL18, de una clona seleccionada de *E. coli* BL21 (DE3), se tomaron muestras a las 2, 4 y 6 horas después de adicionar 2mM de IPTG, una temperatura de incubación de 30°C y 210 rpm de agitación. En la Figura 13 se muestra la expresión de Trx-E2, se seleccionó una clona de *E. coli* Rosetta (DE3) plysS a la cual se le indujo la expresión con 2mM de IPTG, una temperatura de incubación de 25°C, 210 rpm de agitación y se tomaron muestras a las 8 y 16 horas después de adicionado el inductor. Para ambas expresiones se utilizó un control negativo que consistió en la cepa bacteriana sin plásmido, lo cual nos permitió conocer el patrón normal de expresión de proteínas.

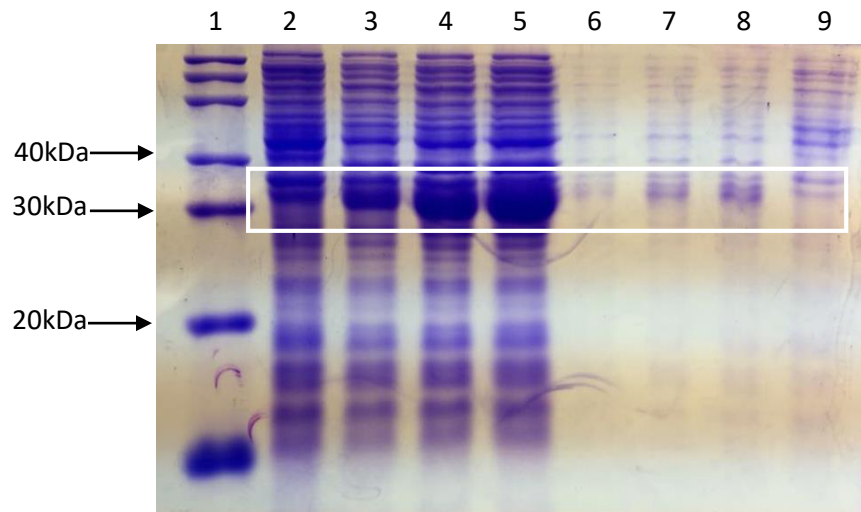


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de la expresión de Trx-IL18 (35kDa). Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Control negativo, fracción soluble. Carril 3-5: Expresión a las 2,4 y 6 hrs, fracciones solubles. Carril 6-8: Expresión a las 2, 4, y 6 hrs, fracciones insolubles. Carril 9: Control negativo, fracción insoluble.

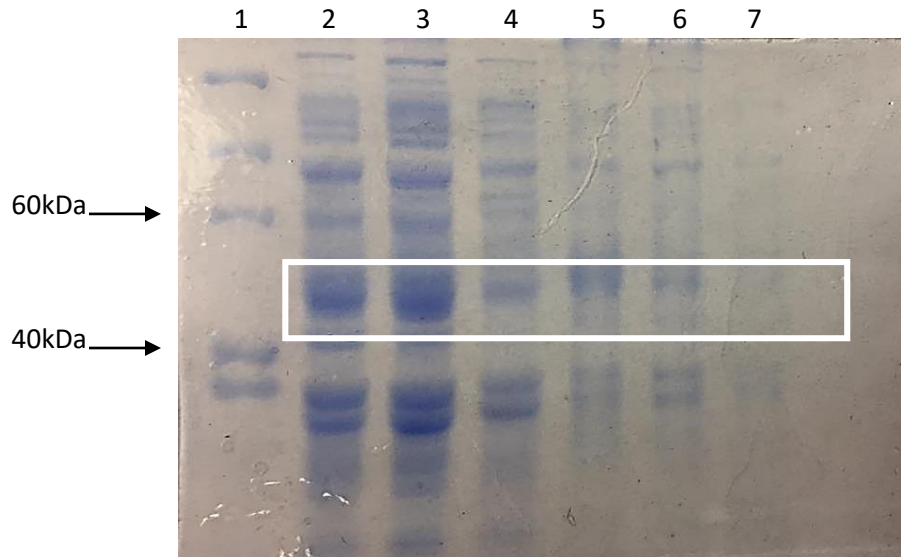


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% de la expresión de Trx-E2 (54kDa). Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2 y 3: Expresión a las 4 y 6 hrs, fracciones solubles. Carril 4: Control negativo, fracción soluble. Carril 5 y 6: Expresión a las 4 y 6 hrs, fracciones insolubles. Carril 7: Control negativo, fracción insoluble.

6.6.- PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Una vez que se realizaron las expresiones piloto, se expresaron 2.5 L de caldo LB y SOC con Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para cada proteína. El sedimento celular fue recolectado y lisado, para posteriormente, obtener el clarificado que se utilizó para el siguiente paso de purificación.

6.6.1.- Cromatografía de Afinidad para las proteínas recombinantes Trx-IL18 y Trx-E2

Se obtuvieron 20 mL de clarificado por cada expresión de las proteínas, primero se purificó Trx-IL18 y después Trx-E2 con ayuda de una columna de cromatografía HisTrap FF de 1 mL. Las fracciones obtenidas en el proceso fueron de un volumen de 0.5 mL y se analizaron por SDS-PAGE para determinar la presencia y pureza de ambas proteínas, como se muestra en las figuras 14 y 15.

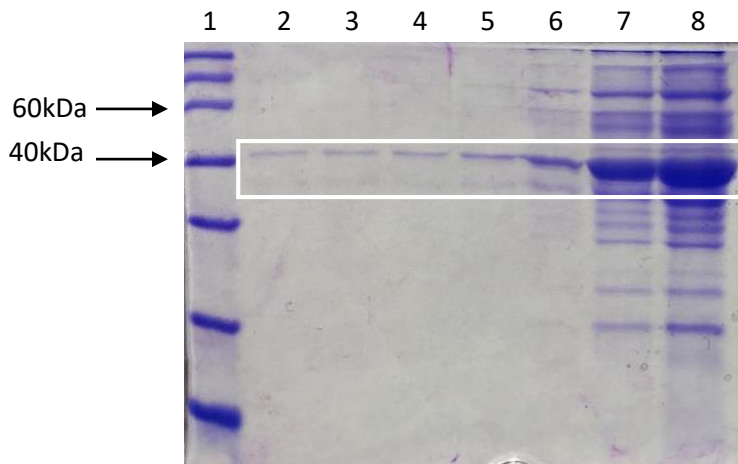


Figura 14. Análisis del proceso de purificación de Trx-IL18 (35kDa) por SDS-PAGE. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2-8: fracciones de elución.

En la figura 15 se representa el proceso de purificación de Trx-IL18, se recolectaron 8 fracciones de elución donde se puede observar que del carril 2 al 5 se obtuvo la proteína con una mayor pureza, del carril 6 al 8 se comienza a observar una mayor cantidad de proteína Trx-IL18, sin embargo, la pureza de

estas fracciones se ve comprometida por la presencia de otras proteínas que se están uniendo a la columna cromatográfica.

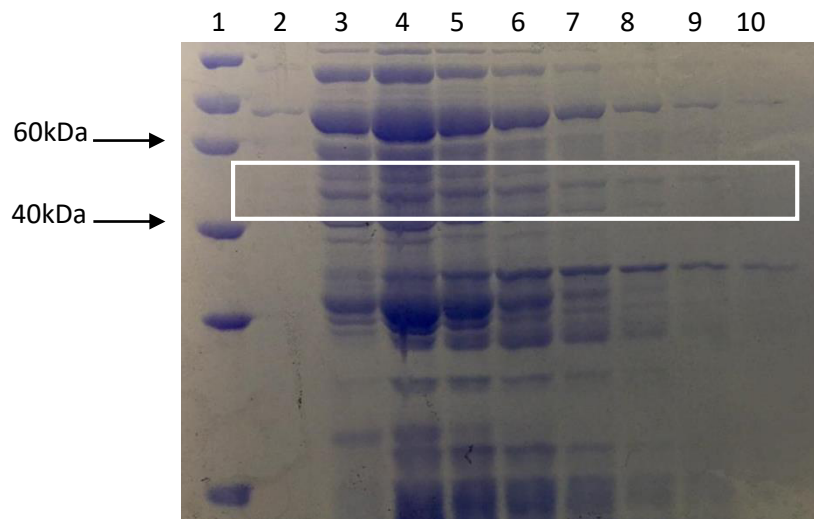


Figura 15. Análisis del proceso de purificación de Trx-E2 (54kDa) por SDS-PAGE. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2-8: fracciones de elución.

La figura 14 representa el proceso de purificación de Trx-E2, se recolectaron 10 fracciones de elución donde se puede observar una baja pureza de la proteína de interés, la cual se ve comprometida por la presencia de otras proteínas que se están uniendo a la columna cromatográfica.

Se analizó el cromatograma de ambas purificaciones, donde se puede observar la señal en el momento de elución de la proteína Trx-IL18 y Trx-E2, figura 16 y 17. Todas las fracciones donde se observaron ambas proteínas de interés se juntaron y se concentraron con la finalidad de retirar la mayor cantidad posible de

Buffer, posteriormente se realizó el proceso de diálisis para eliminar las sales presentes en las muestras de Trx-IL18 y Trx-E2.

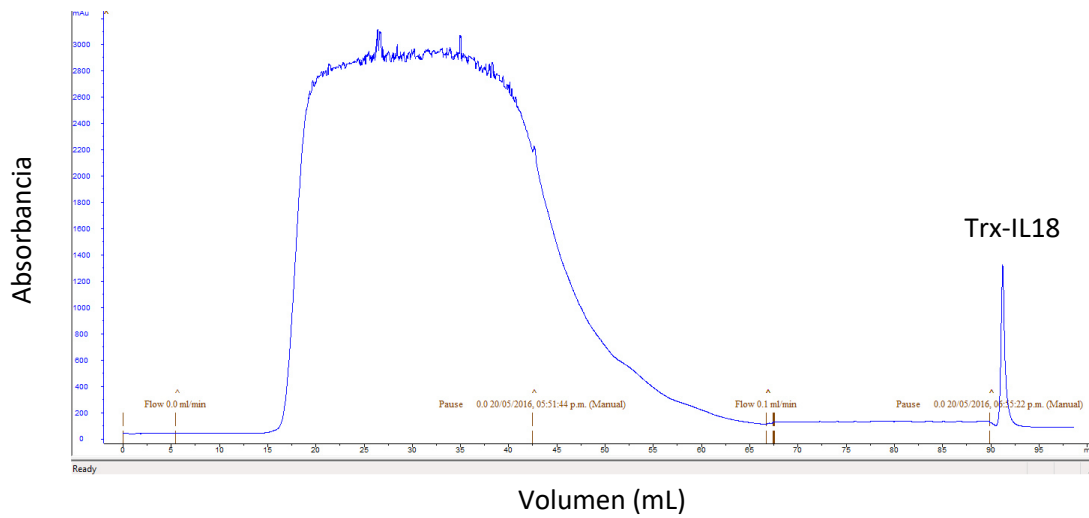


Figura 16. Cromatograma de la purificación de Trx-IL18.

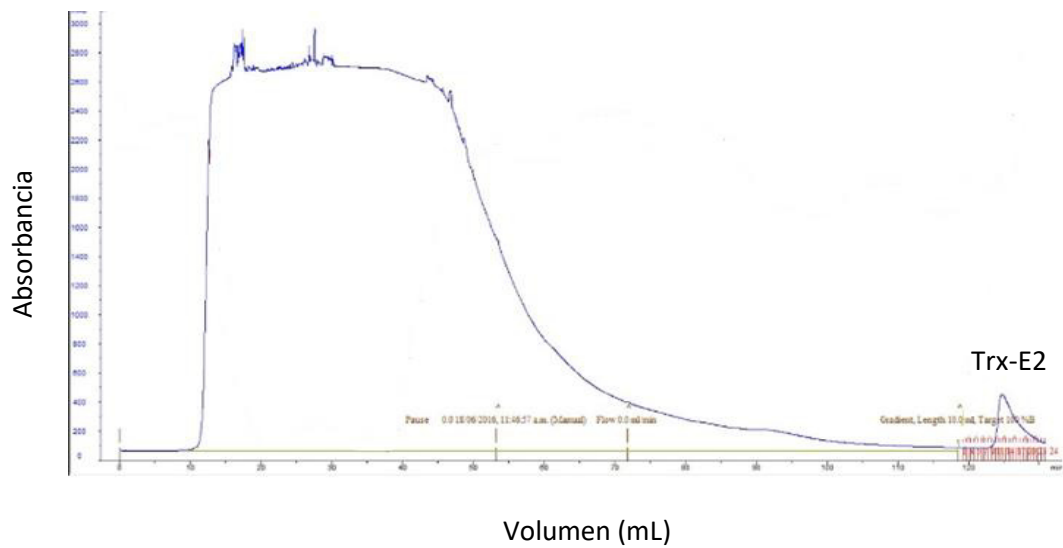


Figura 17. Cromatograma de la purificación de Trx-E2

6.6.2.- Determinación de la concentración de proteínas

La curva de calibración con BSA y la ecuación de la recta obtenida para la cuantificación de las proteínas Trx-IL18 y Trx-E2 por el método de Bradford se presenta en la figura 18.

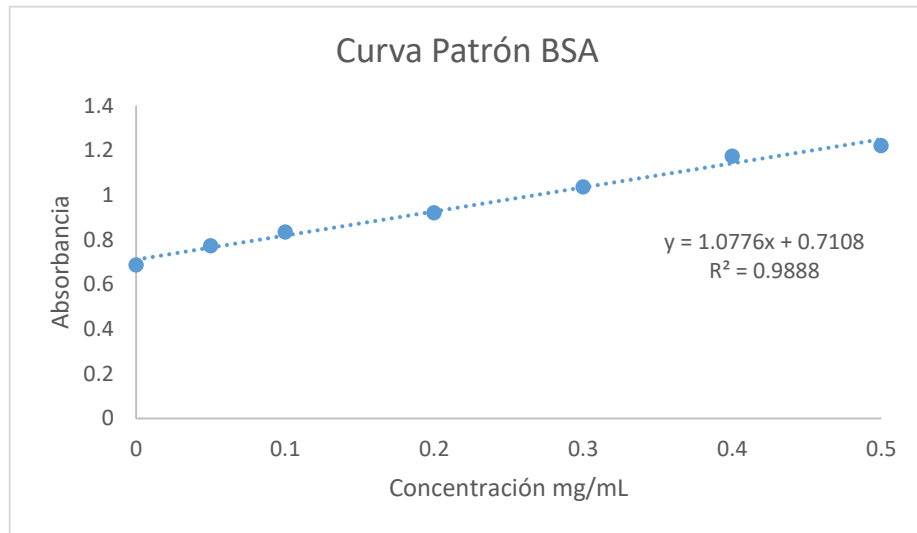


Figura 18. Curva de calibración de BSA para cuantificación de Trx-IL18 y Trx-E2

Con la ecuación de la recta se pudo determinar la concentración de las proteínas purificadas, la tabla XIX muestra la cuantificación de Trx-IL18 y Trx-E2.

Proteína	Absorbancia	Concentración
Trx-IL18	1.175	0.42 mg/mL
Trx-E2	1.01	0.30 mg/mL

Tabla XIX. Cuantificación de proteínas por el método Bradford

6.7.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE IL-18 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES SANOS *in-vitro*.

La actividad inmunomoduladora de IL-18 fusionada a Tioredoxina se evaluó mediante la capacidad de inducir procesos de diferenciación celular de monocitos a macrófagos en muestras de sangre periférica mediante una tinción de Wright y análisis microscópico. La concentración a evaluar de Trx-IL18 fue de 14 ng/mL. Se muestra en la figura 19 la presencia de un monocito (círculo amarillo) y un macrófago (círculo rojo). Se analizaron 10 campos, en los cuales se observó un número total de 60 células blancas, cabe destacar que la concentración de monocitos normal en un paciente sano es de aproximadamente del 2 al 8% del total de glóbulos blancos; por lo que corresponde al porcentaje estimado de monocitos que se encontró. Por otra parte, la presencia de macrófagos en sangre periférica es nula debido a que se localizan en tejido conjuntivo.

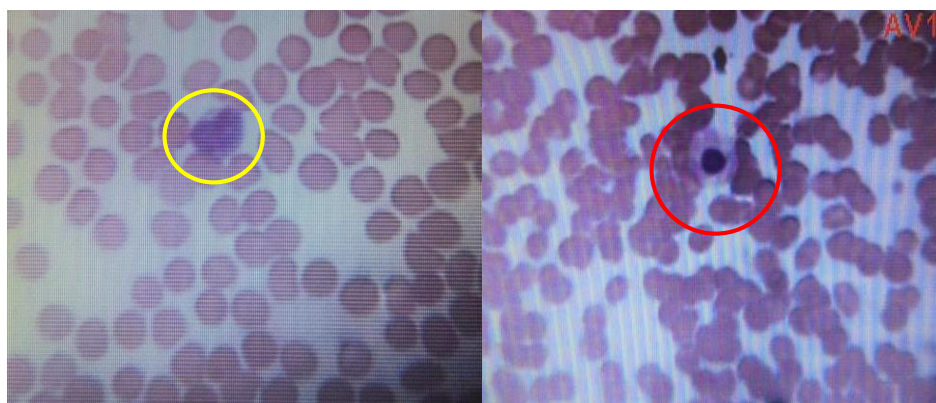


Figura 19. Frotis correspondiente a la inducción con Trx-IL18, a 100X.

En la figura 20 se muestra el frotis realizado para el control negativo que consiste en sangre periférica sin tratamiento alguno, se observan diversos neutrófilos encerrados en círculos amarillos vistos con un objetivo de 100X, sin embargo, no se pudo encontrar macrófagos ni monocitos.

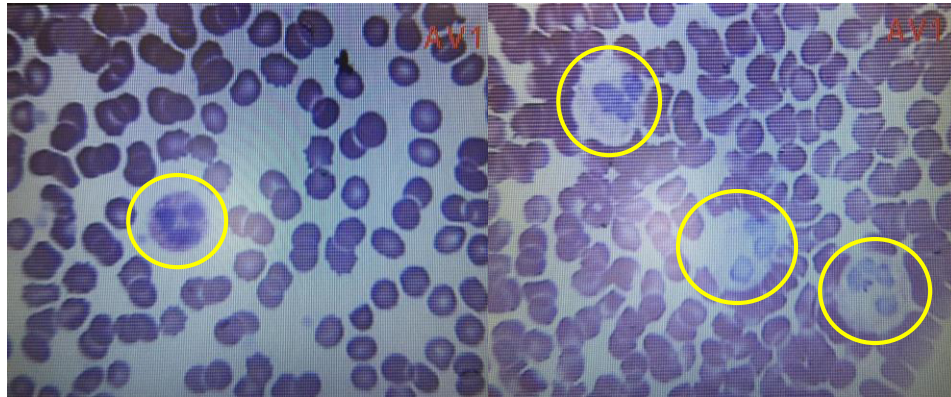


Figura 20. Frotis correspondiente al control negativo a 100X.

Para el control positivo se usaron 10 $\mu\text{g/mL}$ de Lipopolisacárido, se muestra en la figura 21, donde se observaron algunos neutrófilos (encerrados en un círculo rojo) y linfocitos (encerrado en círculo amarillo) después de la inducción. Cabe mencionar que es nula la presencia de monocitos y macrófagos, tomando en cuenta la alta concentración de LPS que se empleó.

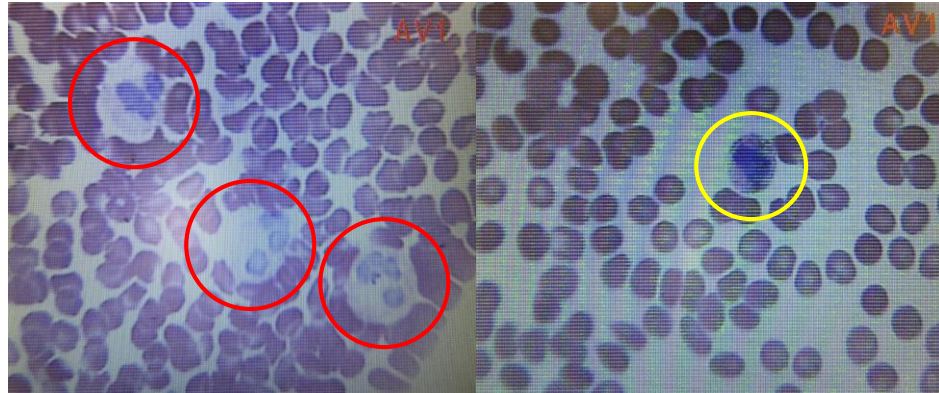


Figura 21. Frotis correspondiente al control positivo a 100X.

6.8.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *in-vitro* DE LA PROTEÍNA E2 EN CELULAS SIHA.

6.8.1.- Ensayo con WST-1

El ensayo de actividad anticancerígena sobre la línea celular SiHa (ATCC® HTB-35™) se llevó a cabo a diferentes concentraciones de la proteína Trx-E2 y el control positivo corresponde a Tritón 1%, el cual lisó las células en su totalidad (100% de muerte celular). Posteriormente, se hicieron los cálculos de viabilidad celular para Trx-E2, los cuales se muestran en la tabla XX.

Concentración de Trx-E2 ($\mu\text{g/mL}$)	% de Viabilidad celular	Desviación estándar
50	84.2	4.7
25	101	1.5
12.5	106	0.75
6.25	102	3.87
3.125	104	1.46

Tabla XX. Evaluación de actividad anticancerígena en células SiHa

En la figura 22 se muestra una gráfica que representa los datos de viabilidad celular de las concentraciones de Trx-E2. Se hace notar el decremento en la viabilidad cuando se llega a los 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

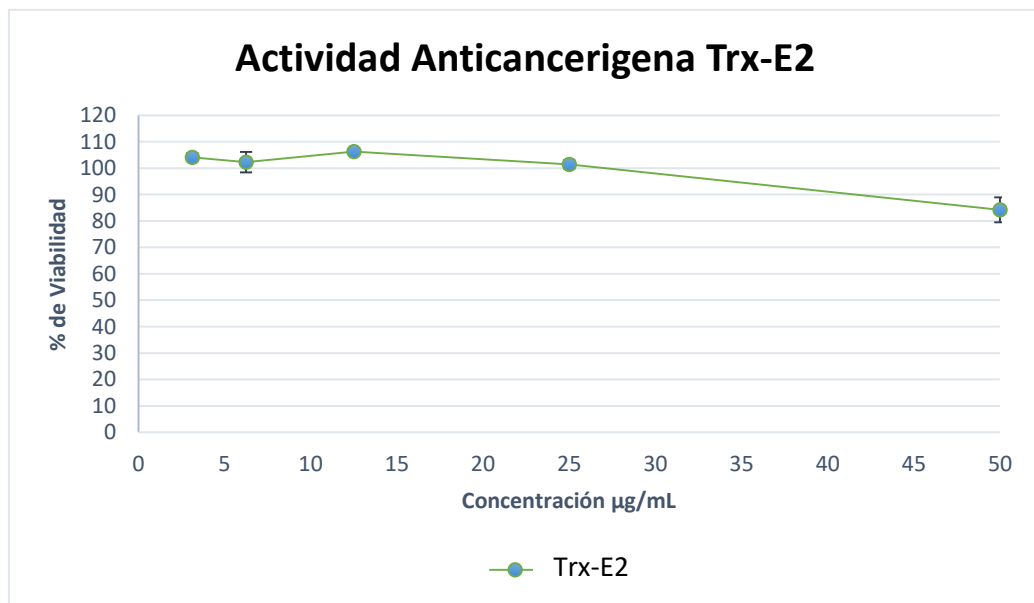


Figura 22. Viabilidad de células SiHa expuestas a Trx-E2

6.8.2.- Ensayo por Caspasa 3

Partiendo del ensayo de WST-1, la disminución en viabilidad observada en la línea celular SiHa se analizó mediante el ensayo de Caspasa 3 para determinar si la muerte de las células es específicamente por mecanismos apoptóticos. La concentración que se empleó de proteína Trx-E2 fue de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el control positivo corresponde a Podofilotoxina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y como control negativo fueron las células sin tratamiento. En la figura 23 se muestra un gráfico de barras en donde se representa la Intensidad de Fluorescencia para cada uno de los controles y la proteína Trx-E2.

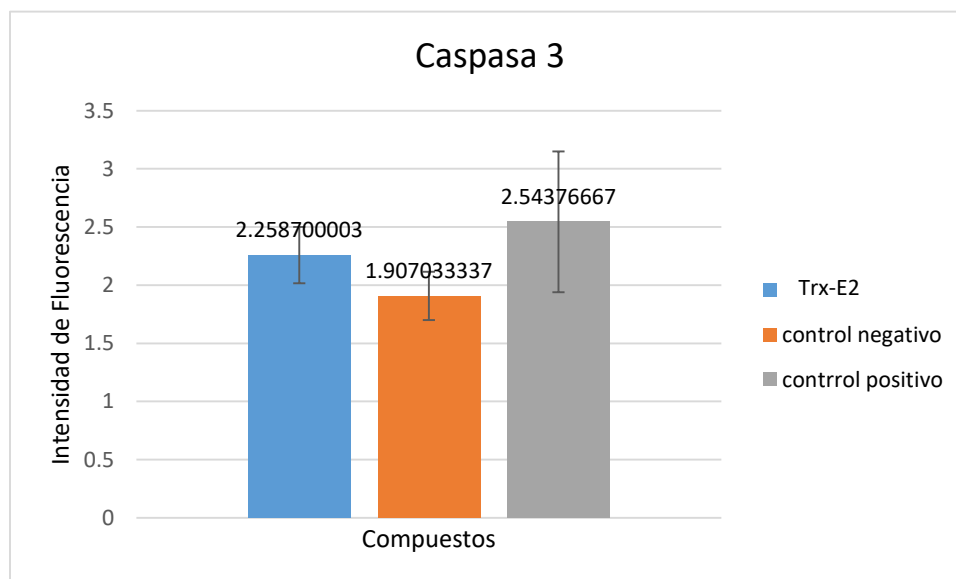


Figura 23. Ensayo de Apoptosis por Caspasa 3

6.8.3.- Análisis Estadístico

Se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA) para corroborar que las medias de las muestras son diferentes. La figura 24 muestra la comparación de las medias entre Trx-E2 y el control positivo (Podofilotoxina), el valor $p= 0.47$ por lo que no hay diferencia significativa.

Resumen

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
E2	6	6.77610001	2.258700003	0.05881033
Podofilotoxina	6	12.7188334	2.54376667	0.3663713

Análisis de Varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.152368133	1	0.152368133	0.57747799	0.476090886	5.98737761
Dentro de los grupos	1.583105867	6	0.263850978			
Total	1.735474	7				

Figura 24. ANOVA de E2 y Podofilotoxina, el valor de probabilidad es mayor a 0.05, por lo que no hay diferencia significativa

El control Negativo (células sin tratamiento) se evaluó contra el control positivo (Podofilotoxina). En la figura 25 se observa un valor de $p= 0.03$ para la comparación de las medias por lo que demuestra haber una diferencia significativa.

Resumen

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control Negativo	6	11.4422	1.907033337	0.04301507
Control Positivo	6	12.7188334	2.54376667	0.3663713

Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.105716376	1	1.105716376	5.92150487	0.037770449	5.11735503
Dentro de los grupos	1.680560533	9	0.186728948			
Total	2.786276909	10				

Figura 25. ANOVA del Control Negativo y Control Positivo, el valor de probabilidad es menor a 0.05, por lo que hay diferencia significativa.

Por último, se compararon las medias entre Trx-E2 y el Control Negativo, la figura 26 muestra que hay una diferencia significativa, donde el valor de probabilidad (0.05) es menor o igual a 0.05.

Resumen

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	6	12.4162	2.06936667	0.1542724
Columna 2	6	11.4422	1.90703334	0.04301507

Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.247338889	1	0.247338889	5.20406684	0.05653263	5.59144785
Dentro de los grupos	0.332696	7	0.047528			
Total	0.580034889	8				

Figura 26. ANOVA de Trx-E2 contra el Control Negativo, el valor de probabilidad es igual a 0.05, por lo que hay diferencia significativa.

CAPÍTULO 7

7.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El gen Interleucina 18 se logró amplificar por medio de PCR, mostrando un tamaño de 595 pb (Figura 3), a partir del ADN molde sintetizado y optimizado por la empresa biotecnológica “General Biosystem”. La optimización de codones permite expresar en un cien por ciento genes de origen eucariótico en sistemas de expresión procariótico como la cepa *E. coli* BL21(DE3)³⁴. El gen E2 de VPH 16, fue amplificado por PCR obteniéndose un tamaño de 1098 pb (Figura 4); es importante mencionar que este gen no fue sintetizado y optimizado, por lo tanto, se decidió usar una cepa *E. coli* Rosetta (DE3) *plysS* que mejora la expresión de proteínas eucarióticas que contienen codones raramente usados en *E. coli*. Esta cepa suministra tRNAs para codones AGG, AUA, CUA, CCC, GGA en un plásmido con resistencia a cloramfenicol.³⁵ Una desventaja de usar *E. coli* para la expresión de proteínas heterólogas es la formación de cuerpos de inclusión o agregados proteicos, los cuales son proteínas insolubles que deben ser solubilizadas y replegadas para tener actividad biológica, por lo que en estos

últimos años se han estudiado proteínas de fusión tales como MBP, GST, Tioredoxina, NusA, Fh8, entre otras, confiriendo una alta solubilidad y grado de purificación por técnicas cromatográficas³⁶. El vector de clonación pThioHis-B porta un gen que codifica para la proteína de fusión Tioredoxina que se encuentra separado del sitio de clonación múltiple por medio de una secuencia que codifica para cuatro aminoácidos Aspartatos y una Lisina, residuos de aminoácidos importantes como sitio de reconocimiento para una Enterokinasa y la consecuente liberación de la proteína de interés (IL-18 y E2) de la proteína de fusión. Tioredoxina es una proteína mutada en tres residuos de aminoácidos a Histidina confiriéndole afinidad a iones metálicos (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}) para la purificación de las proteínas IL-18 y E2. Nuestros resultados mostraron que la expresión con una temperatura de inducción de 30°C, 2 mM de IPTG y 210 rpm de las proteínas Trx-IL18 y Trx-E2 recombinantes se obtuvieron en un 80% en fracciones solubles, como lo muestran las electroforesis en gel de poliacrilamida de las Figuras 8 y 9. Esto es debido a que Tioredoxina es una proteína intracelular termoestable, altamente expresada en citoplasma y evita la formación de cuerpos de inclusión mediante el aprovechamiento de su actividad oxidorreductasa intrínseca responsable de la reducción de los enlaces disulfuro a través de intercambio de tio-disulfuro³⁷. Por otra parte, los resultados obtenidos de la purificación por cromatografía de afinidad para Trx-IL18 y Trx-E2 mostraron una baja pureza, véase Figura 10 y 11. Ambas proteínas son purificadas por medio de la interacción de las Histidinas de Tioredoxina con los iones Ni^{2+} de la columna, eluidas con una concentración de 250 mM de Imidazol. Sin embargo, la pureza se ve afectada por la presencia de otras proteínas propias de la bacteria que se

están uniendo a la columna, esto es debido principalmente a la presencia de residuos de histidina en la superficie de la estructura terciaria o sitios de unión a metales biológicamente relevantes. Algunas de estas proteínas citoplásmicas contaminantes se han identificado como SlyD, Can, ArnA, y AceE críticas para la viabilidad celular, especialmente bajo las condiciones de estrés causadas por la expresión de proteínas de alto rendimiento³⁸. Un factor importante para el corte con Enterokinasa es el contar con una cantidad suficiente de proteína Trx-IL18 y Trx-E2 (>0.1 mg/mL) y una pureza alta, nuestros resultados mostraron una baja pureza y concentración, por lo que se decidió realizar las evaluaciones de dichas proteínas fusionadas a Tiorredoxina; cabe destacar que Tiorredoxina es una proteína que juega un papel importante en la regulación redox de la homeostasis celular. Las células cancerosas viven en un ambiente estresado por lo que dependen de los sistemas redox producto de Tiorredoxina para la protección contra la señalización desregulada por el estrés³⁹. Se considera que Tiorredoxina como proteína de fusión podría coadyuvar en la protección y solubilidad para IL-18 y E2. Se ha puesto de manifiesto que diversas proteínas como el GM-CSF, IL-12 y EGF, solo por citar algunos casos, como proteínas de fusión han demostrado no afectar la funcionalidad de IL-18^{18, 19, 26, 27}. Por consiguiente, en base al análisis realizado, Trx-IL18 mostró tener actividad biológica inmunomoduladora al estimular la diferenciación de monocitos a macrófagos, se llevaron a cabo las observaciones microscópicas en un total de 10 campos, en los cuales se observó un total de 60 células blancas. Cabe destacar que el nivel de monocitos presentes en sangre periférica representa de un 2 al 8% del total de glóbulos blancos, por lo que se considera representativo de la muestra el

monocito y el macrófago que se observó en la figura 15. Los macrófagos son células fagocíticas cuya presencia no es normal en sangre periférica y no obedece algún trastorno fisiopatológico o cuadro inflamatorio. Por otro lado, el Lipopolisacárido es una molécula altamente conservada en organismos procarióticos usada para la estimulación del sistema inmunológico en sistemas eucarióticos, algunos estudios han demostrado la capacidad de diferenciación de monocitos a células dendríticas mediante el uso de 1 µg/mL de LPS, 10 ng/mL de GM-CSF y 10 ng de IL-4¹⁹, lo cual pone de manifiesto el uso de algunas otras moléculas que actúan como mensajeros químicos y favorecen el proceso de diferenciación. Por lo que se considera que el LPS por si solo es incapaz de estimular la diferenciación, tomando en cuenta que se usó una concentración 10 veces mayor a lo ya reportado. Es de importancia continuar la evaluación sobre una línea celular de monocitos, con lo que se pueda asegurar una población de estudio, así como el análisis de secreción de citocinas tales como IFN-γ por parte de células mononucleares de sangre periférica (Linfocitos y monocitos). Por otra parte, hasta el momento no se tienen reportes de la administración exógena de E2 como proteína a algún cultivo celular. Gran número de estudios se adentran en procesos de transfección y reexpresión de E2 en células SiHa o HeLa, donde se ha observado que las células pasan a un estado de senescencia caracterizado por una respuesta celular frente a estímulos que tienen la potencialidad de causar transformaciones y que está dada en un arresto de su crecimiento, y que no específicamente entran a apoptosis⁴⁰. Nuestros resultados demuestran que una administración exógena de la proteína Trx-E2 a una concentración de 50 µg/mL pueden llevar a apoptosis a células SiHa *in-vitro* por

medio de la activación de la Caspasa 3, Nitu y cols³² han reportado la inducción de apoptosis mediante la activación de la procaspasa 8 que pertenece a la vía extrínseca y que activa a la Caspasa 3 efectora mediante un ensayo *pull-down* que permite conocer interacciones físicas entre dos o más proteínas. No podemos aseverar que la apoptosis que observamos en SiHa sea por vía extrínseca o intrínseca debido a que no hay reportes si E2 tiene la capacidad de entrar a las células por endocitosis o si en efecto interacciona con receptores de muerte que conducen a una señalización celular río abajo hasta activar a dominios de muerte asociados a FAS (FADD) como lo menciona Nitu y cols. La figura 20 muestra un esquema de la apoptosis por ambas vías, las cuales comparten a las caspasas efectoras 3,6 y 7. Es importante mencionar que se necesita retirar Tioredoxina para corroborar que el efecto es propio de E2 y pudiese aumentar su actividad anticancerígena.

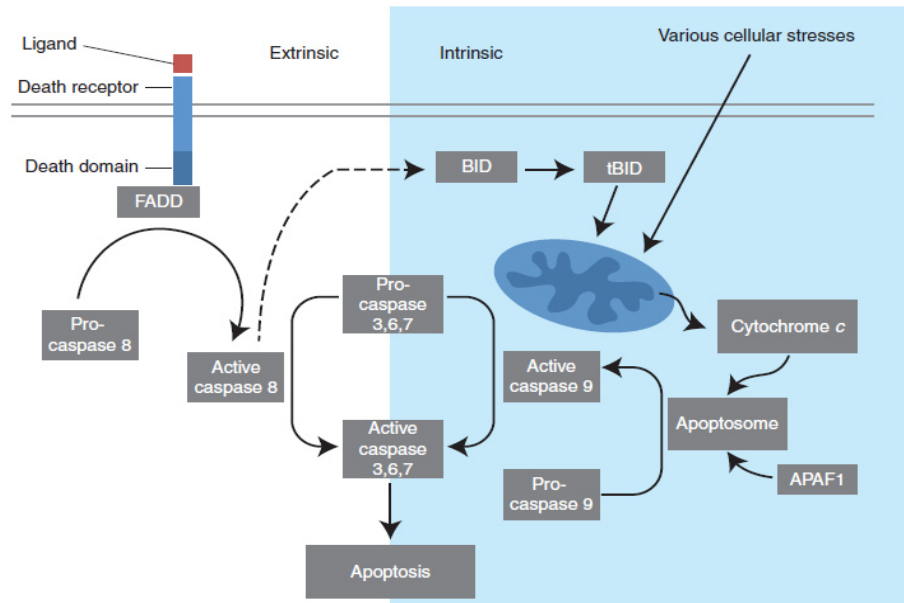


Figura 27. Vía de las caspasas

Como perspectiva, se pretenderá separar las proteínas de interés de la proteína de fusión Tioredoxina, los resultados mostraron un efecto que habla de IL-18 y E2 como proteínas biológicamente activas.

CAPÍTULO 8

8.- CONCLUSIONES

- La obtención de las proteínas Interleucina 18 y E2 de VPH recombinantes fusionadas a Tioredoxina se obtienen en un alto nivel de expresión en sus formas solubles.
- La proteína IL-18 optimizada fusionada a Tioredoxina muestra tener efecto biológico inmunomodulador sobre monocitos de sangre periférica.
- La proteína E2 fusionada a Tioredoxina muestra ser una proteína con actividad anticancerígena ante la línea celular SiHa (VPH16).

CAPÍTULO 9

9.- PERSPECTIVAS

Se recomienda el uso de una proteína de fusión adicional a Tiorredoxina que mejore la fuerza intrínseca de unión en cromatografías de afinidad a iones metálicos, así como el uso de vectores que contengan el promotor T7 para sistemas de expresión como *E. coli* BL21 (DE3) que expresan la T7 ADN Polimerasa, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de expresión de proteínas y la completa saturación de la columna cromatográfica tal como los vectores pET de Novagen. Por el contrario, usar sistemas basados en péptidos para el transporte de proteínas al espacio periplásmico de la bacteria con la finalidad de mejorar las modificaciones postraduccionales propias de la proteína de interés y por choque osmótico liberarla al medio de cultivo para una mejor purificación evitando proteínas propias del sistema de expresión. El uso de sistemas eucarióticos es una alternativa a los ya mencionados, evitando la optimización de codones y obteniendo de igual manera las proteínas en el medio

de cultivo, algunas de sus desventajas son los costos que conlleva su manipulación y cuidado, así como sistemas como biorreactores para la expresión de proteínas. Se considera necesario liberar a Tioredoxina y evaluar IL-18 pura sobre una línea celular con la finalidad de corroborar su actividad inmunomoduladora, de igual manera evaluar E2 pura para comparar resultados en ensayos de apoptosis por Caspasa 3. Implementar un modelo que involucre el análisis de IL-18 y E2 sobre un carcinoma murino, y fusionar ambas proteínas para hacer un análisis comparativo de las proteínas solas y fusionadas. Etiquetar E2 con la finalidad de conocer su localización celular cuando se administra a un cultivo celular.

REFERENCIAS

1. Karp G. 2014. *Biología Celular y Molecular, Conceptos y Experimentos*. 7ª ed. México: McGraw Hill.
2. Kindt J.T. Goldsby A.R. Osborne A.B. *Inmunología de kuby*. 7ª ed. México: McGraw Hill.
3. Srivastava S, Pelloso D, Feng H, et al (2013). Effects of interleukin-18 on natural killer cells: costimulation of activation through Fc receptors for immunoglobulin. *Cancer Immunol Immunother*, 62, 1073-82.
4. Tse BW, Russell PJ, Lochner M, et al (2011). IL-18 inhibits growth of murine orthotopic prostate carcinomas via both adaptive and innate immune mechanisms. *PLoS One*, 6, e24241.
5. Kuppala MB, Syed SB, Bandaru S, et al (2012). Immunotherapeutic approach for better management of cancer--role of IL-18. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 5353-61.
6. Sugawara, S., Uehara, A., Nochi, T., Yamaguchi, T., Ueda, H., Sugiyama, A., Hanzawa, K., Kumagai, K., Okamura, H., Takada, H. (2001) Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J. Immunol.* 167, 6568–6575.
7. Kathryn H. Doble R. Wasson C. (2014). Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Increases Production of the Anti-Inflammatory Interleukin-18 Binding Protein in Keratinocytes. *Journal of Virology*. p. 4173–4179.

8. Dinarello A.C. (2006). Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 289:1-10.
9. Beas C. Ortuño D. *Biología Molecular, Fundamentos y Aplicaciones*. México: Mc Graw Hill.
10. Sandoval J. Esteller M. (2012). Cancer epigenomics: beyond genomics. *Genetics & Development*. 22:50-55.
11. Secretaria de Salud. *Información Estadística: Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer cérvico uterino*. Consultado el 15/07/2016, Disponible en [<http://www.gob.mx/salud/accionesyprogramas/informacionestadistica>].
12. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Pathol J*. 189: 12-1.
13. Best S. (2012). Biology of Human Papillomavirus Infection and Immune Therapy for HPV-Related Head and Neck Cancers. *Otolaryngol Clin*. 807-822.
14. Hamid A.N. Brown C. & Gaston K. (2009). The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66:1700-1710.
15. Xue Y. Toh S. He P. (2015). HPV16-E2 induces prophase arrest and activates the cellular DNA damage response *in vitro* in precursor lesions of cervical carcinoma. *Oncotarget*. 6,33.

16. Day P. Roden R. Lowy D. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* 72: 142-50.
17. Young C. Britton Z. Robinson A. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol.J.* 620-634.
18. Wigginton J. Lee J. Wiltrot T. (2002). Synergistic engagement of an ineffective of IL-18 and IL-2 tumor eradication by combined administration induction of IFN-g and Fasligand-dependent, *J. Immunol.* 169: 4467–4474.
19. Lee R. Park Y. Shin B. (2016). Effects of tumor vaccine expressing Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor and Interleukin-18 on cancer cells and its possible application for cancer immunotherapy. *Cytokine J.*
20. Li Y. Yu W. Yu Z. (2011). Sun, Enhancement of the immunogenicity of DNA replicon vaccine of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A by GM-CSF gene ajuvant, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 33: 211–219.
21. Yang J. Chen L. Xu B. Sun J. (2014). Intracellular Distributing and Interferon- γ Secretion of Human Interleukin-18 in BxPC-3 Cells. *International Journal of Medical Sciences.* 11: 172-179.
22. Reading P. Whitney P. Barr D. (2007). IL-18, but not IL-12, regulates NK cell activity following intranasal herpes simplex virus type 1 infection. *J Immunol.* 79: 3214-21.

23. Blattman J. Greenberg P. (2004). Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science*. 305(5681):200–205.
24. Rosenberg S. (2004). Shedding light on immunotherapy for cancer. *Medicine J*. 350(14):1461–1463.
25. Gaffen S. Liu K. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*. 28(3):109–123.
26. Du G. Ye L. Zhang G. Dong Q. (2012). Human IL18-IL2 fusion protein as a potential antitumor reagent by enhancing NK cell cytotoxicity and IFN- γ production. *Cancer J*. 138: 1727-1736.
27. Lu J. Peng Y. Zheng Z. Pan J. (2007). EGF-IL-18 fusion protein as a potential anti-tumor reagent by induction of immune response and apoptosis in cancer cells. 260: 187-197.
28. Lee K. Cho K. Kim S. Shim J. (2005). IL-18 E42A mutant is resistant to the inhibitory effects of HPV-16 E6 and E7 oncogenes on the IL-18 mediated immune response. *Cancer Letters*. 229:261-270.
29. Kim S. Azam T. Novick D. Yoon. (2002). Identification of amino acid residues critical for biological activity in human interleukin-18. *J. Biol. Chem*. 277: 10998–11003.
30. Hengstermann A. Linares L. Ciechanover A. (2001). Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 98: 1218-1223.
31. Ramirez N. Guerra F. Camporeale G. (2015). Expressions of E2 and E7-HPV16 proteins in pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix. *The Biological Stain Commission Biotechnic & Histochemistry*. 1-8.

32. Singh N. Senapati S. & Bose K. (2016). Insights into the mechanism of human papillomavirus E2-induced procaspase-8 activation and cell death. *Scientific Reports*. 6:21408.
33. Brown C. Kowalczyk A. Taylor E. (2008). P53 represses human papillomavirus type 16 DNA replication via the viral E2 protein. *Virology J*. 5:5.
34. García J. Santana Z. Zumalacárregui L. Quintana M. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*. 2:30-39.
35. Sorensen H. & Mortensen K. (2005). Advanced Genetics strategies for Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology J*. 115: 113-128.
36. Costa S. Almeida A. Castro A. Domingues L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 5.
37. Yasukawa T. Ishii C. Maekawa T. Fujimoto J. (1995). Increase of Solubility of Foreign proteins in *Escherichia coli* by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 43: 25328-25331.
38. Robichon C. Luo J. Thomas B. Causey J. (2011). Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize *E. coli* Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*. 4634-4646.
39. Garth P. D Lynn K. (2007). Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. *ELSEVIER*. 7:392-397.

40. Prabhavathy D. Subramanian K.C. & Karunakaran D. (2015). Re-expression of HPV16 E2 in SiHa (human cervical cancer) cells potentiates NF- κ B activation induced by TNF- α concurrently increasing senescence and survival. *Bioscience Reports*. 35.
41. Sanders N. Mishra A. (2016). Role of Interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases. *ELSEVIER*.
42. Kinoshita M., Miyasaki H. (2013). Immunoenhancing therapy with Interleukin-18 against bacterial infection in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *Journal of Leukocyte Biology*.
43. Blachon S. & Demeret C. (2003). The regulatory E2 proteins of human genital papillomaviruses are pre-apoptotic. *ELSEVIER*. 85:813-819.
44. Schenker A. Straub E. Iftner T. & Stubenrauch F. (2013) Cell-type-dependent activities of regulatory regions and E2 proteins derived from carcinogenic and non-carcinogenic human alphapapillomaviruses. *Journal of General Virology*. 94: 1343-1350.
45. Salazar R. Centeno F. Nieto K. Hernández V. Salcedo M & Garrido E. (2011). HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation. *Virology Journal*. 8:247.
46. Lu X.J. Peng Y. Meng F.Z. Jin Q.L. Lu S. Y. & Guan X. M. (2005). Rational design of an EGF-IL-18 fusion protein: Implication for developing tumor therapeutics. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 334: 157-161.
47. Alboni S. Cervia D. Sugama S. & Conti B. (2010). Interleukin 18 in the CNS. *Journal of Neuroinflammation*. 7:1-9.

48. Tsusumi N. Kimura T. Arita K. Ariyoshi M. Ohnishi H. Yamamoto T. Zuo X. Maenaka K. Park E. Kondo N. Shirakawa M. Tochio H & Kato Z. (2014). The structural basis for receptor recognition of human Interleukin-18. *Nature*. 5:53.
49. Alagkiozidis I. Facciabene A. Tsiatas M. Carpenito C. Benecia F. Adams S. Jonak Z. June C. Powell D. & Coukos G. (2011). Time-dependent cytotoxic drugs selectively cooperate with IL-18 for cancer chemo-immunotherapy. *Journal of Translational Medicine*. 9:77.
50. Gauson J. Windle B. Donaldson M. Caffarel M. Dornan S. E. Coleman N. Herzyk P. Henderson C. S. & Wang X. (2014). Regulation of human genome expression and RNA Splicing by human papillomavirus 16 E2 protein. *Virology*. 10-18.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

QFB Jorge Solís Estrada

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: Generación de Interleucina 18 humana y proteína reguladora E2 recombinantes y su potencial aplicación en la terapia contra el cáncer.

Edad: 25 años

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en el estado de Guerrero el 3 de Junio de 1991, hijo de Jorge Solís Zúñiga y Antonia Estrada Gordillo.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Guerrero, obteniendo el grado de Químico Farmacéutico Biólogo en el 2014.