



---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LA UTILIDAD DE ANTÍGENOS  
DEL VIRUS DE LA POLIO PARA LA  
INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER DE PIEL  
( MELANOMA ).**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
( BIOLOGÍA EXPERIMENTAL )**

**P R E S E N T A**

**WENDY ESPINOSA HERNÁNDEZ**

**DIRECTORA: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA**

**MÉXICO. D. F.**

**MARZO 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Esta tesis fue realizada con el apoyo CONACYT  
con número de becario 189695**

*El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:*

TUTORA DE TESIS

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Armando Isibasi Araujo

Unidad de Investigación Médica en Inmunología  
de la Unidad Médica de Alta Especialidad,  
Hospital del Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Rosalva Rangel Corona

Unidad de investigación en Diferenciación Celular y Cáncer  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

A los miembros del Jurado Examinador:

Dr. Rafael S. Saavedra Durán  
Departamento de Inmunología  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Rosalva Rangel Corona  
Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Dr. Alberto Monroy García  
Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Dra. Marcela Lizano Soberón  
Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer  
Instituto Nacional de Cancerología, UNAM

Agradezco a todos por la revisión y la asesoría en este trabajo.

***ESTUDIO DE LA UTILIDAD DE ANTÍGENOS DEL VIRUS DE LA POLIO PARA LA INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER DE PIEL (MELANOMA).***

***RECONOCIMIENTOS***

La autora desea reconocer y agradecer a la Q. F. B. Rosalba Pérez Villalva del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas por el excelente apoyo técnico que brindó para la realización de esta tesis.

Así mismo deseo agradecer y reconocer a la M. V. Z. Georgina Díaz Herrera del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; por su asesoría y colaboración en el manejo de los animales que se utilizaron para la realización de este trabajo.

## ***DEDICATORIAS***

A mis padres, Eloy y Neftalí por su apoyo, cariño y confianza durante toda mi vida.

A mis hermanos, Verónica, Raúl, Xochilt y Cristian por su cariño y paciencia.

A mis cuñados: Ángel, Stephany, Esteban por su cariño y entusiasmo.

A mis queridos sobrinos, Ángel, Agustín, Diana, Raúl y Adrián por las nuevas esperanzas que han hecho resurgir en mí.

A toda mi familia por su interés y entusiasmo que me proporcionaron todo este tiempo.

A Cleo por su apoyo y amistad.

A fallis por su amistad y aliento.

**El futuro es incierto pero aquí comienza todo  
con nuevas esperanzas de que todo  
será posible y maravilloso.**

**W. E**

## ÍNDICE GENERAL

Sección	Página
1.- Índice de figuras	I
2.- Índice de tablas	II
3.- Índice de abreviaturas	III
4.- Resumen	1
5.- Abstract	3
6.- Introducción	4
I.    Cáncer de piel	4
• Crecimiento tumoral	5
• Incidencia	6
II.   Tratamientos del cáncer	7
• Cirugía	7
• Quimioterapia	7
• Radioterapia	8
III.  Inmunoterapia	8
IV.  Virus de la poliomielítis humana	12
• Organización del genoma	14
• Ensamble de la cápside viral	15
• Ciclo de vida	15
• Mecanismo de infección	16
• Respuesta inmune y vacunas	18
• Propiedades inmunogénicas de las proteínas VP1, VP2 y VP4	18
7.- Objetivos	21
• Objetivo general	21
• Objetivos específicos	21
8.- Hipótesis	21
9.- Materiales y métodos	22
• Plásmidos	22
• Células	22



• Virus	22
• Animales	22
• Purificación del ADN plasmídico (procedimiento de minipreparación) mediante lisis alcalina	23
• Restricción enzimática	23
• Electroforesis de ADN en geles de agarosa	24
• Electroelución del ADN plasmídico	24
• Purificación de ADN plasmídico por extracción con fenol-cloroformo y precipitación por etanol (Modificación de Maniatis et. al, (1989))	24
• Purificación de ADN plasmídico por congelación	25
• Reacciones de ligación	25
• Transformación de células competentes	25
• Amplificación de las secuencias codificadoras de las proteínas de la cápside del virus de la poliomielitis por PCR (Polymerase Chain Reaction)	26
• Stock en glicerol de células bacterianas transformadas	27
• Purificación de ADN plasmídico por cromatografía	27
• Reacción de secuenciación	27
• Inducción de tumores	28
• Tratamiento de tumores	28
• Obtención de biopsias de tumores	28
• Extracción de ADN de las biopsias	29
• Extracción de proteína total de las biopsias	29
• Western blot	29
• Inmunización de animales con la vacuna oral anti-poliomielítica	30
• Obtención de sueros	30
• Ensayo de proliferación celular	31
• Cultivo de virus de la polio	31
• Ensayo de infección <i>in vitro</i> de células HeLa por poliovirus. Determinación de la dosis letal 50 (DL <sub>50</sub> ) y la dosis letal	

100 (DL <sub>100</sub> )	31
• Ensayo de inhibición de la infección por poliovirus	32
• Inmunocitoquímica de células infectadas con virus de la polio	32
• Análisis estadístico	33
10.- Resultados	34
• Construcción y caracterización de los plásmidos pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4	34
- Clonación de los genes VP1, VP2, VP4 en el vector de expresión pDISPLAY.	34
• Inducción de tumores	43
• Tratamiento de tumores con los plásmidos pDISVP1, pDISVP2 o pDISVP4.	46
11.- Discusión	52
12.- Conclusiones	60
13.- Perspectivas	61
14.- Apéndices	62
15.- Referencias	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Introducción

Número	Título	Página
1	Fases de crecimiento del melanoma	6
2	Imagen tridimensional del virus de la polio	13
3	Genoma de Picornavirus y Expresión	14
4	Ensamble de la cápside del virus de la polio	15
5	Síntesis y liberación del virus de la polio	17

### Resultados

6	Amplificación del gen VP1 del virus de la polio por PCR	35
7	Análisis de la presencia del gen VP2 del virus de la polio por PCR	36
8	Escrutinio del gen VP4 mediante PCR	37
9	Comparación de secuencias de VP1	38
10	Alineación de secuencias del gen VP2	40
11	Cotejo de secuencias de VP4	42
12	Desarrollo de tumores de melanoma en ratones	44
13	Imágenes de ratones con tumores de melanoma	45
14	Sobrevida de ratones con tumores	46
15	Tratamiento de tumores de ratones con los plásmidos.	47
16	Western blot de proteínas totales de tumores tratados con los plásmidos pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4.	49
17	Análisis de la presencia de anticuerpos por inmunocitoquímica (100x)	50
18	Ensayo de Inhibición de la infección por poliovirus en células HeLa	51

## ÍNDICE DE TABLAS

### Resultados

Número	Título	Página
1	Análisis comparativo del tratamiento de tumores	48

## Índice de abreviaturas

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	deoxinucleótidos trifosfato
<b>g</b>	gravedades
<b>gr</b>	gramos
<b>h</b>	hora
<b>M</b>	molar
<b>mg</b>	miligramo
<b>mg/ml</b>	miligramos por mililitro
<b>min</b>	minuto
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>ng</b>	nanogramo
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>U</b>	unidades
<b>Uv</b>	ultravioleta
<b>V</b>	volts
<b>µg</b>	microgramo
<b>µl</b>	microlitro
<b>µM</b>	micromolar

## **RESUMEN**

De las diversas estrategias para combatir el cáncer, la inmunoterapia es una de las más prometedoras ya que busca estimular la respuesta inmune del propio paciente para combatir y eliminar a las células malignas. Esta terapia intenta aprovechar la especificidad, la capacidad de respuesta y la memoria de las células del sistema inmune y de sus moléculas efectoras. Además tiene la ventaja de que evita los efectos sistémicos indeseables de las terapias convencionales. Para despertar una respuesta inmune específica contra las células malignas es necesario que éstas expresen antígenos diferentes a los de las células sanas y así sean reconocidas como extrañas y posteriormente eliminadas. En años recientes se ha reportado que la inyección directa de ADN plasmídico, que codifica para proteínas antigénicas, en organismos vivos induce la expresión de los antígenos en las células transfectadas *in vivo*. Por otro lado, se sabe que la inmunización con la vacuna oral anti-poliomielítica induce una inmunidad de por vida, y que dicha reacción es dirigida contra antígenos en las proteínas de la cápside viral (VP1, VP2 Y VP4). Por lo tanto, en el presente trabajo se indujo el crecimiento de tumores en ratones previamente inmunizados con la vacuna oral anti-poliomielítica. Posteriormente, se administraron directamente en el tumor los plásmidos pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4 conteniendo las secuencias génicas de las proteínas estructurales del virus de la polio. Los resultados indican que el tratamiento de los tumores con los plásmidos antes mencionados, no produjo efecto visible en el crecimiento tumoral. Para tratar de explicar la falta de respuesta, se llevó a cabo un análisis de la presencia de los plásmidos en las células tumorales por PCR, así como de la expresión de los genes clonados por Western Blot. Los resultados del análisis por PCR mostraron una baja eficiencia de transfección, ya que solo fue posible amplificar la secuencia de VP1 en 4.6% de los tumores que habían sido tratados con el plásmido pDISVP1. Con respecto a la secuencia VP2 ésta no pudo ser amplificada en ninguno de los tumores tratados con pDISVP2, por último solo en 3.1% tumores tratados con el plásmido pDISVP4 se amplificó la secuencia de VP4. Por otro lado, el análisis de proteínas mostró resultados pocos satisfactorios, debido a la ausencia de las proteínas virales VP1, VP2 y VP4 en los tumores tratados con los plásmidos antes mencionados. En conjunto, estos resultados indican que el método de transfección directo de tumores *in vivo* con ADN desnudo presenta una baja eficiencia por lo que no es recomendable

su uso para la expresión de antígenos en este tipo de modelo. Por lo tanto, es importante explorar cuál es la forma de transfección más adecuada para poder optimizar y aprovecharlos en el desarrollo de inmunoterapias anti-tumorales.

## **ABSTRACT**

Immunotherapy is a promising strategy to treat cancer, it seeks to stimulate the patient's own immune response to recognise and eliminate malignant cells. This therapy aims to harness the specificity, responsiveness and memory of the immune system and its effector molecules. It also has the advantage that it avoids the undesirable systemic effects of conventional therapies. In order to raise a specific immune response, malignant cells must express antigens which are not found in normal cells. In recent years it has been reported that direct injection of plasmid DNA, encoding antigenic proteins, in living organisms induces the expression of antigens in the transfected cells *in vivo*.

On the other hand, it is known that immunization with the oral anti-polio vaccine induces immunity for life, and that the reaction is directed against antigens on the viral capsid proteins (VP1, VP2 and VP4). Therefore, in this project we induced tumours in mice previously immunized with the anti-polio oral vaccine. Subsequently, plasmids pDISVP1, pDISVP2 and pDISVP4 containing the sequences of the structural proteins of the poliovirus were injected into the tumours. The results indicate that treatment with plasmids had no visible effect on tumour growth. In an attempt to explain the lack of response, an analysis of the presence of plasmids in tumour cells by PCR was carried out, as well as the expression of the genes products by Western Blot. The results of the analysis by PCR showed a low efficiency of transfection. The sequence of VP1 was amplified in 4.6% of the tumors treated with plasmid pDISVP1. The sequence of VP2 could not be amplified in any of the tumours treated with pDISVP2. Finally, only 3.1% of tumours treated with plasmid pDISVP4 showed amplification of the VP4 sequence. On the other hand, the capsid proteins could not be detected by Western blot analysis of total proteins from treated tumours. Taken together, these results indicate that direct injection of tumours with naked DNA has a low efficiency of transfection *in vivo*, and is therefore not advisable to use for the expression of antigens in this type of model. Therefore it is important to explore more efficient ways of transfection *in vivo* to optimize the development of anti-tumour immunotherapy.



# ***INTRODUCCIÓN.***

## **I.- CÁNCER DE PIEL.**

El cáncer es un desorden que surge después de la acumulación de múltiples alteraciones en diferentes genes en las células somáticas a lo largo del tiempo, provocando que estas células pierdan la capacidad de regular la proliferación, las características del tejido de origen y su posición; esto puede ser producto de la interacción con factores genéticos susceptibles y la exposición ambiental (Coman, 1953; Risom, 2005; Tysnes, 2007; Caldwell, 2008; Ballestar, 2008).

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que aparece cuando los melanocitos se convierten en malignos (forman un gránulo pigmentoso). Estas células elaboran un pigmento llamado melanina, responsable del color de la piel, del pelo y del iris de los ojos. La melanina, por su parte, funciona como un fotoprotector evitando que la radiación solar dañe las estructuras o los tejidos del cuerpo (Jackson, 1968; Silagi, 1969; Chalmers, 1976; Kricker, 2007; Belmar-López, 2008).

El melanoma aparece como un lunar preexistente que cambia, o como un nuevo lunar en la piel previamente clara; del 20 al 40 % está asociado con lunar displásico (alteración en tamaño, forma y organización de las células) y puede originarse en cualquier edad pero más comúnmente ocurre después de la pubertad. Además puede presentar formas, volúmenes y colores variables y se puede observar y medir sin dificultad; en los hombres aparece generalmente en el tronco, desde la espalda hasta la cadera, en la cabeza o en el cuello; en cambio, en las mujeres se desarrolla principalmente en las piernas o en el tronco. (Jackson, 1968; Davis, 1973; Pack, 1962; Belmar-López, 2008).

La mayoría de los melanomas se localizan en la piel y menos frecuentemente en mucosas, pero dado el origen de los melanocitos –derivan de la cresta neural, pueden observarse en otras localizaciones como retina y meninges donde también migran los melanocitos. Los melanocitos derivan de la cresta neural y durante el desarrollo embriológico se diferencian hacia melanoblastos y migran hacia la piel. Tras alcanzar la dermis migran a la epidermis o el folículo piloso y se diferencian hacia lunares melanocíticos. Las funciones de los melanocitos epidérmicos es la de producir melanina y transferirla a los queratinocitos que los rodean. Además de la función de producir melanina los melanocitos dan lugar a uno de los tumores más frecuentes del organismo: los lunares melanocíticos. (Mintz, 1967; Davis, 1973; Ito, 1993)

Según diversos estudios clínicos, histopatológicos, inmunológicos y genéticos, existen 5 niveles de progresión de los tumores melanocíticos:

1. Nevus (lunar) melanocítico benigno.
2. Nevus atípico.
3. Melanoma maligno primario de crecimiento radial.
4. Melanoma maligno primario en fase de crecimiento vertical.
5. Melanoma metastático (Jackson, 1968).

### **CRECIMIENTO TUMORAL.**

El melanoma tiene un comportamiento biológico que determina el pronóstico ya que presenta dos fases de crecimiento, una radial (intraepidérmica) y otra vertical (intradérmica). En la fase de crecimiento radial [figura 1(A)], e inicia con la proliferación de melanocitos en a capa epidérmica, que puede durar meses o años, la tumoración está limitada a la epidermis sin presentar la capacidad de producir metástasis. El crecimiento melanocítico afecta toda la epidermis [figura 1(B)]. En ambas situaciones la extirpación quirúrgica es curativa. En la fase de crecimiento vertical [figura. 1(C)], la tumoración invade la dermis y pasa a invadir el tejido graso y producir metástasis linfáticas o sanguíneas [figura 1(D)]. Este crecimiento del melanoma maligno hace necesario que al establecerse el diagnóstico, tenga que determinarse en qué fase de crecimiento se encuentra, con la finalidad de establecer el pronóstico y el tratamiento. (Davis 1973; Slominski, 2001; Poetsch, 2003)

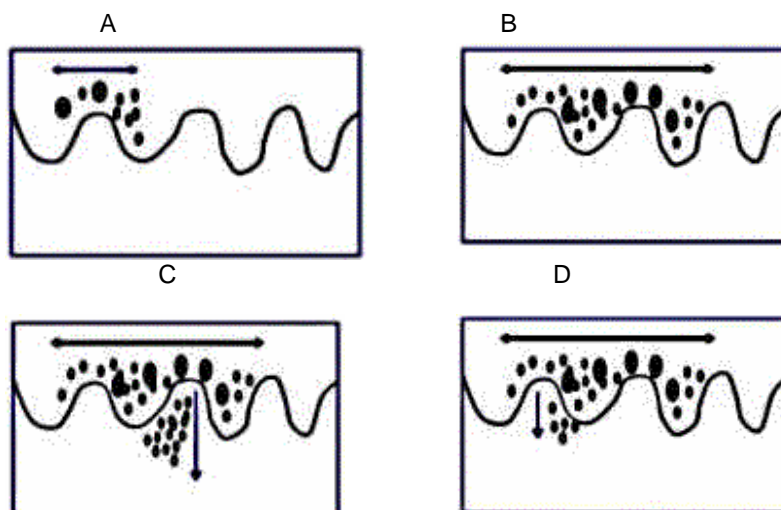


Figura. 1 Fases de crecimiento del melanoma

- A) Los melanomas se inician en la epidermis con la proliferación de melanocitos en la unión dermo-epidérmica y B) de forma gradual presentan un crecimiento intraepidérmico para afectar a toda la epidermis. C) Cuando inician la fase de crecimiento vertical, rompen la unión dermo-epidérmica y D) pasan a invadir la dermis papilar, reticular y tejido graso subcutáneo. Tomada de la página de Internet [www.fihu-diagnostico.org.pe/.../39-41.html](http://www.fihu-diagnostico.org.pe/.../39-41.html)

## INCIDENCIA.

Cada año se producen en el mundo 100.000 nuevos casos y su incidencia se sitúa entre el 1.5 y el 7 %, lo que representa el 2.5% de todos los cánceres. El melanoma es el sexto cáncer más común en hombres y el séptimo cáncer más común en mujeres. En total representa el 65% de todas las muertes por cáncer de piel, lo que indica su alto potencial de agresividad y capacidad metastásica. Se desarrolla de “novo” en el 75% de los casos y en el 25% se desarrolla sobre un lunar preexistente. Un 3% de pacientes desarrollan melanomas ocultos (enfermedad metastásica sin evidencia de tumor). Un 50% de melanomas se observan en personas menores de 50 años y el 35% en menores de 35 años. (Pack, 1962; Tejeda, 1996; Bataille, 2003; Diffey, 2005) Además la incidencia de cáncer aumenta si se tiene un transplante, pues es un factor de riesgo (Lindelof, 2000).

La radiación solar –ultravioleta- es el factor etiopatogénico más importante en el desarrollo del melanoma maligno. La exposición excesiva a la radiación ultravioleta de la luz del sol puede ser un factor que contribuye a algunos casos de melanoma. Los

periodos cortos de exposición intensa están asociados con un incremento de dos veces el riesgo de melanoma. (Hussein, 2005). Otros factores de riesgo identificados incluyen agentes químicos, físicos e inmunológicos; por ejemplo la inmunosupresión puede inducir cáncer. (Greene, 1983; Bale, 1986, Allison, 1970, Lindelof, 2000; Bataille, 2003; Chaudru, 2004; Meyskens, 2006)

## **II.- TRATAMIENTOS DEL CÁNCER.**

### **CIRUGÍA.**

Uno de los primeros tratamientos utilizados para eliminar el cáncer fue la cirugía, que es el procedimiento por el cual se remueve el tumor completo junto con tejido cercano y nódulos linfáticos regionales. Esta terapia está limitada al tipo, comportamiento y tamaño del tumor, así como al sitio anatómico donde se localiza y a la presencia de metástasis. Sin embargo, tiene grandes efectos colaterales como por ejemplo pérdida de peso, disfunciones fisiológicas y mutilación. Hoy en día todavía se practica aunque con nuevos procedimientos y su éxito es muy alto en pacientes con tumores pequeños no invasivos. (Goldman, 1964; Onuigbo, 1962; Bremers, 1999) Otro de los tratamientos que se utiliza solo o combinado con cirugía es la quimioterapia.

### **QUIMIOTERAPIA.**

Esta terapia fue propuesta por el médico alemán Paul Ehrlich, y utiliza fármacos que impiden la multiplicación de las células cancerosas o llevan a su muerte. Los fármacos o quimioterapéuticos se clasifican en diferentes grupos:

- Agentes alquilantes: Interfieren la división celular.
- Antimetabolitos: parecidos a los productos originados en el metabolismo de la célula, pero que conducen a la muerte de ésta.
- Antibióticos: Inhiben el crecimiento de los tumores.
- Derivados de plantas: Diferentes sustancias procedentes de plantas tienen actividad anticancerosa. (Bane, 1957; Scott, 1970)

Estos fármacos pueden administrarse de diferentes formas: a través de un comprimido por vía oral; mediante un suero o inyección intravenosa; por inyección intramuscular o mediante una inyección a través de una punción en la médula ósea. Actualmente se utilizan nuevos medicamentos, por ejemplo. carboplatino, cisplatino,

ciclofosfamida, doxorubicina. Esta terapia sola o combinada con la cirugía permite a algunos pacientes sobrevivir más tiempo aunque con un nivel de vida bajo por sus efectos secundarios, como por ejemplo: diarrea, vómitos, anemia, afectación cardíaca, afectación pulmonar, y renal entre otros (Boylard, 1946; Frei, 1985; Scott, 1970; Skipper, 1964; Tarhini, 2008, Tauceri, 2008). Otra de las terapias que se utilizan para eliminar el cáncer es la radioterapia que generalmente se combina con las dos anteriores para tener un éxito mayor al tratar de controlar la lesión cancerosa.

### **RADIOTERAPIA.**

Esta terapia es realizada mediante la utilización de compuestos que emiten radiaciones ionizantes (rayos x, radiaciones gamma, partículas beta y alfa) lejos o cercana al tumor, para destruir las células cancerosas. (Quick, 1954). Esta terapia también tiene efectos secundarios graves por ejemplo: descamación cutánea, náuseas, vómitos, fibrosis pulmonar, fibrosis mediastínica, pericarditis, hipotiroidismo, nefritis, etc. Actualmente se utilizan las bombas de cobalto, el acelerador lineal y el betatrón que favorecen la eliminación de las células cancerosas en algunos cánceres como por ejemplo de mama, piel (melanoma), genitourinario, gastrointestinal, ginecológico, de cabeza y cuello entre otros (Reifler, 1986).

Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos no ofrecen grandes esperanzas ya que su éxito en general es bajo y limitado a ciertos cánceres, de pequeño tamaño, no metastáticos y de fácil acceso. (Fidler, 1978; Delaney, 2004; Delaney, 2005) En el caso de la cirugía se debe tener cuidado de no romper la cápsula del tumor, si no se provocaría invasión a otros tejidos. (Ihse, 2003) Con respecto a la quimioterapia y a la radioterapia son sus efectos secundarios y la distinta manera en que responde los pacientes al tratamiento su principal limitante. Aún actualizando sus técnicas y usos de manera combinada su efecto benéfico es limitado (Powers, 1976; Bernier 2004; Pan, 2004) Es por ello que se están desarrollando nuevas terapias.

### **III.- INMUNOTERAPIA**

La posibilidad de intervenir el cáncer a nivel inmunológico fue conceptualizada hace más de cien años, cuando en 1890 William Coley trató pacientes con sarcoma con extractos bacterianos (toxinas de Coley) intentando activar la inmunidad sistémica, y donde parte de ella fuese dirigida contra el tumor. En estos experimentos observó

que algunos tumores disminuían de tamaño o desaparecían y otros seguían creciendo. (Coley, 1891). Esto dio pie a que el poder de la respuesta inmune podría ser controlado y aplicado a la eliminación específica de las células cancerosas. (Burdick, 1937; McCarthy, 2006)

La inmunoterapia como tal vio la luz hace más de 2 décadas y está basada en el hecho de que nuestro sistema inmune, una vez activado, es capaz de desarrollar una inmunidad específica contra células neoplásicas pero no contra las células normales. Además ofrece un potencial muy prometedor, pues propone la idea de curar el cáncer o al menos tratarlo de manera individual sin los efectos colaterales de la mayoría de los tratamientos anteriores y sin riesgo aparente para el humano.

La inmunoterapia puede ser clasificada en dos modalidades principales (Benjamini, 1979):

A) Inmunoterapia no específica: mediante la activación de la respuesta inmune por medios no específicos, por ejemplo sensibilizadores de contacto, inmunopotenciadores, bacterias, polinucleótidos, citocinas.

B) Inmunoterapia específica: mediante la activación de la respuesta inmune dirigida específicamente contra algún antígeno dado.

Esta última puede hacerse bajo diferentes enfoques terapéuticos:

- \* La inmunoterapia activa, busca la estimulación de los componentes del sistema inmune responsables de la respuesta antitumoral ej. Citocinas, antígenos tumorales, células presentadoras de antígeno modificadas que expresen proteínas y péptidos de tumores. (Urugel, 2001)
- \* La inmunoterapia pasiva, en la que se administra anticuerpos antitumorales conjugados a moléculas tóxicas, radioisótopos o drogas. (Dunman, 2003)
- \* La inmunoterapia adoptiva, mediante la transferencia de células T efectoras antitumorales. (Deckers, 1971; Perreault, 2002; Xue, 2007)

Gracias a los avances tecnológicos, moleculares e inmunológicos en el conocimiento del control normal del crecimiento, la diferenciación celular y la transformación maligna, han permitido a los investigadores desarrollar una gran diversidad de estrategias experimentales que han sido utilizadas en diversidad de tumores. Las principales son la utilización de células tumorales autólogas (Soiffer, 1998), o la utilización de células tumorales alogénicas para inducir remisiones

tumorales (Hsueh, 2002; Hsueh, 2003), el uso de antígenos tumorales para aumentar la función de células TCD4 específicas de antígeno (Touloukian, 2002), el empleo de antígenos tumorales de distintas líneas celulares tumorales (Bystryn, 2001) o la utilización de toxinas bacterianas como BCG, de la difteria, de estafilococos A y B. (Kominsky, 2001), anticuerpos anti-tumorales como BRCA1 (Pérez-Vallés, 2001), EGFR (Gainet, 2003) vectores virales (Harrop 2006<sub>a</sub>, Harrop 2006<sub>b</sub>) y por último ADN plasmídico desnudo que puede expresar diferentes antígenos como proteínas del virus de la hepatitis B (Davis, 1994), proteínas del VIH (Liu, 1996; Shiver, 1995), proteínas del virus de la influenza (Donnelly, 1995), albúmina de huevo (ova) (Boyle<sub>a</sub>, 1997), lizosima de huevo de gallina (Boyle<sub>b</sub>, 1997) o beta-galactosidasa (Wei, 2001). Además existen muchos estudios que demuestran que la inyección directa de plásmidos de ADN por diferentes vías de administración, por ejemplo epidermal, dermal, oral, respiratoria y otras rutas inducen respuesta inmune. (Prud'homme, 2005)

Los avances en virología y biología molecular han permitido el desarrollo de inmunoterapias basadas en secuencias individuales más que en los patógenos o células completas. Por ejemplo, se han introducido secuencias que marquen a los tumores para llevar a cabo una citotoxicidad o la modulación más específica de la respuesta inmune. Resultados más favorables fueron obtenidos por la inyección intratumoral directa de Allovectin-7, un plásmido de ADN que codifica para las moléculas HLA-B7 y  $\beta$ 2- microglobulina compuesto con una mezcla de lípidos catiónicos, lo que causó una regresión tumoral en el 18% de los pacientes sugiriendo el efecto local y sistémico de este plásmido (Bergen, 2003).

Las estrategias básicas más utilizadas para la inmunoterapia del cáncer basadas en la inyección de plásmidos de ADN son la introducción de citocinas a través de un vector, como la IL-2 (Kammunla, 1998; Hersey, 2003); el aumento de la expresión de HLA (Browning, 1997; Rees, 1999; Tait, 2000); por último la sobreexpresión de los antígenos tumorales como por ejemplo antígenos de melanoma o antígenos de HPV (Jäger, 2001).

Sin embargo la mayoría de estos tratamientos tienen resultados poco satisfactorios, cómo regresiones espontáneas y algunas remisiones completas o no se ha visto efecto, o aún no ha sido abordada para el uso rutinario humano o veterinario, inclusive alguna pueden inducir respuesta celular pero con diferentes potencias.

Para que la inmunoterapia sea efectiva es necesario que se activen la inmunidad mediada por células. En forma general, los linfocitos T citotóxicos (CTL) que expresan

el receptor CD8 en su superficie juegan un papel importante en la eliminación de células transformadas y de células infectadas por virus. Los antígenos virales son presentados en la superficie de la célula infectada en forma de péptidos cortos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I. Estos péptidos de 8-11 aminoácidos, son generados por proteólisis en el citoplasma de una célula infectada y son transportadas al retículo endoplásmico. Después el complejo de MHC-I junto con el péptido viral y la  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m), migran a la superficie celular en donde son reconocidos por el CTL mediante el receptor de célula T (TCR) de la especificidad apropiada. La activación de los CTL's requiere del reconocimiento de antígenos sobre células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) como los macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, las cuales expresan altos niveles de MHC-I y MHC-II.

Por otra parte, los linfocitos T cooperadores (THL), los cuales son  $CD4^+$ , tienen un papel importante en la inducción de la respuesta inmune. Este tipo de linfocitos proveen de citocinas que son mediadores químicos proteicos para la comunicación intracelular. Estas citocinas puede activar a los linfocitos B para la producción de anticuerpos y también pueden activar y sostener la respuesta citotóxica de los linfocitos  $CD8^+$ . A diferencia de los linfocitos  $CD8^+$ , los  $CD4^+$  reconocen antígenos exógenos, los cuales son tomados del medio que rodea a las APCs por medio de endocitosis o fagocitosis. Estos antígenos son procesados en endosomas en donde son degradados en fragmentos peptídicos de 11-15 aminoácidos. Estos endosomas de bajo pH, contienen moléculas MHC clase II, a los que se les unen los péptidos generados. A diferencia de las moléculas MHC-I, las cuales se presentan en todas las células nucleadas, las moléculas MHC-II se presentan sólo en APC profesionales como macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, las cuales además de contener altos niveles de MHC-II, también son ricas en moléculas coestimuladoras como B7-1 que son importantes para la activación celular (June, 1994).

La mayoría de los epítopes peptídicos que han sido definidos para las células T  $CD4^+$  son derivados de proteínas exógenas o unidas a membrana, porque éstas tienen acceso a la vía MHC-II. El resultado de una respuesta inmune primaria productiva es la generación de memoria que persiste por años. Con respecto a los linfocitos B de memoria, estos no producen anticuerpos pero expresan Ig de membrana, sobreviven durante semanas, meses o años y recirculan en la sangre, linfa y órganos linfoides. La estimulación de estas células por el antígeno genera respuestas de anticuerpos



secundarias. Por otro lado, las células T CD4 de memoria producen grandes cantidades de citocinas. Las células T CD8 necesitan de la reestimulación con el antígeno para adquirir sus funciones citotóxicas (Ahmed, 1996).

Lo anteriormente expuesto indica que la respuesta inmune de memoria tiene un gran potencial y que se está utilizando como una herramienta para la inmunoterapia del cáncer. Algunos de los antígenos que con mayor frecuencia inducen el desarrollo de memoria inmunológica de larga duración son los antígenos virales. Quizá el mejor ejemplo sea el virus de la polio, que atenuado en cultivo de tejidos y utilizado como vacuna oral, estimula el desarrollo de una inmunidad que permanece durante el resto de la vida del individuo vacunado. Se ha demostrado que dicha inmunidad está mediada por clones de células B y T CD8<sup>+</sup> de memoria.

Por otro lado existen pocos estudios que utilizan antígenos exógenos para aumentar la respuesta anti-tumoral a través extractos de membrana de células tumorales obtenidos de cultivo de células tumorales infectadas con el virus de la influenza (Boone, 1971; Gillete, 1976; Lindermann, 1974; Takeichi, 1978) o VSV (Lindenmann, 1970; Wise, 1977). Otro de los antígenos que se han utilizado contra el melanoma para inducir una respuesta son BCG (Lieberman, 1975; Kopf 1975) y viruela (Harnack, 1974; Hermann, 1970).

#### **IV.- VIRUS DE LA POLIOMIELITIS HUMANA.**

Los *Enterovirus* constituyen un amplio grupo de virus causantes de importantes infecciones humanas, pertenecen a la familia ***Picornaviridae*** (pico=pequeño, rna=virus de RNA, Figura 2) e integran el género más virulento debido a que provocan una gran cantidad de manifestaciones clínicas y subclínicas donde los pacientes pueden sufrir desde una enfermedad febril leve hasta una parálisis muy severa y permanente que puede ser fatal. (Delves, 1994; Evans, 1991)

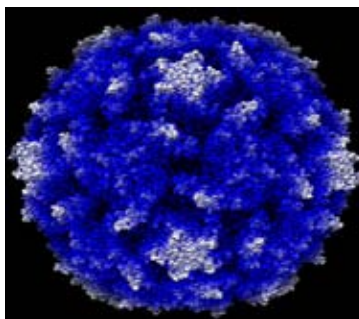


Figura 2. Imagen tridimensional del virus de la polio. Tomada de la página de internet <http://www.childrenshospital.org/research/Site2029/mainpageS2029P6sublevel7Flevel14.html>

Los *Enterovirus* han sido responsables de epidemias como la poliomielitis (griego polios=gris), también llamada parálisis infantil, causada por los poliovirus; poliovirus es un nombre genérico que se aplica a tres tipos de virus: *Brunhilde* (tipo 1), *Lansing* (tipo 2), y *León* (tipo 3); el tipo 1 es el responsable de las epidemias, siendo la enfermedad más seria causada por este género. Se llama infantil porque los enfermos que contraen la enfermedad son especialmente los niños entre cinco y diez años. (Klone, 1955).

El registro más antiguo de poliomielitis se dió en 1300 A C en Egipto en el que se ve a un sacerdote con una deformidad en una pierna típica de poliomielitis. El primer caso de la era moderna apareció a finales del siglo XIX en países desarrollados y de allí se extendió a países en vías de desarrollo. Fue descrita por primera vez por el alemán Jacob *Heine* en 1840 y se divide en tres clases: la primera, la poliomielitis abortiva, es una enfermedad febril inespecífica de 2-3 días de duración, sin signos en el Sistema Nervioso Central, apetito disminuido, vómito, estreñimiento y malestar general. Un segundo grupo de enfermos puede, además presentar una meningitis aséptica, fiebre, malestar general, dolor en los músculos del cuello, del tronco, los brazos, las piernas, rigidez del cuello y de la columna vertebral. La recuperación es rápida y completa, generalmente en unos días. La tercera clase o poliomielitis paralítica es la infección de consecuencias posibles más graves y suele ir precedida de un período de fiebre y "enfermedad menor" clásicamente; los síntomas desaparecen después de varios días.

De los 5 a los 10 días, la fiebre reaparece seguida de signos de irritación meníngea debilidad generalizada, respiración debilitada, dificultad para tragar, y

parálisis fláccida asimétrica como parálisis de la vejiga y de los músculos. (Cameron, 1952; Gromeier, 1998; Jubelt, 2004, [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/infosisner\\_polio.html](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/infosisner_polio.html)).

### ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

Los *Enterovirus* presentan una cápside de simetría icosaédrica formada por 60 protómeros, sin envoltura lipídica por lo que son resistentes a éter u otros solventes; tienen un tamaño de 20-30nm, poseen RNA de cadena única de 7209-18450 nucleótidos y polaridad positiva, por lo que se replican utilizando el propio RNA como mensajero. Su genoma se divide en 4 regiones que codifican proteínas estructurales y 2 regiones no codificadoras, reguladoras (Figura 3). La cápside está compuesta de cuatro proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4. Éstas se sintetizan como una poliproteína en la que el extremo 5' está unida covalentemente a una pequeña proteína VPg de 20 a 24 aminoácidos. Poseen en el extremo 3' residuos de ácidos adenílico (secuencia de Poli-A). La unión de las proteínas VP1 Y VP3 da lugar a la formación de un canal estructural que es utilizado por el virus para unirse al receptor celular. (Evans, 1991; Minor, 1996; Ohka, 2001; Wilson, 1991).

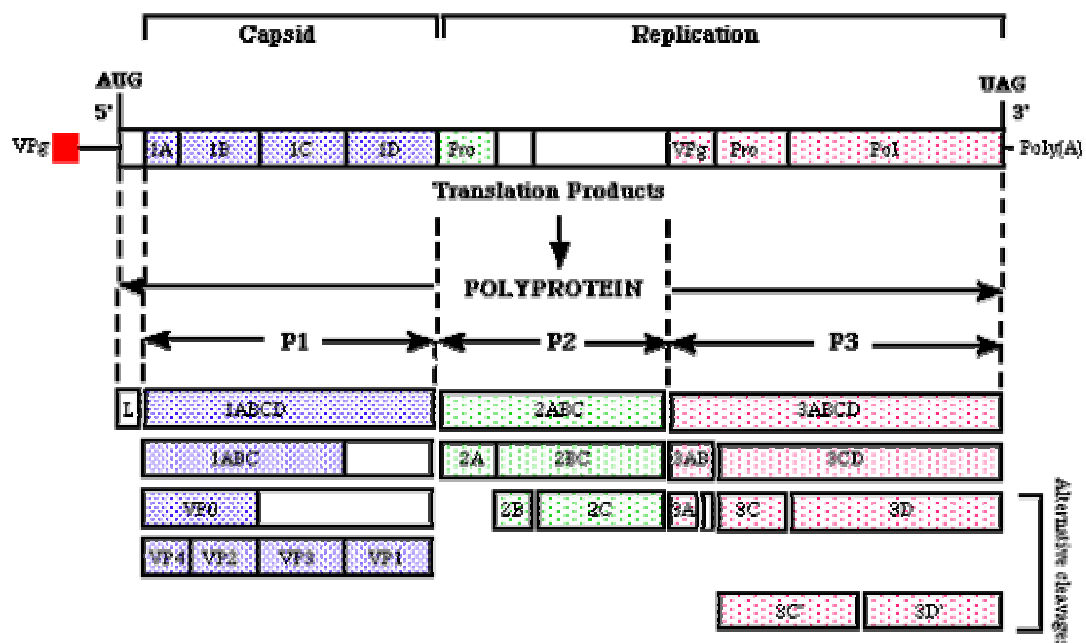


Figura 3. Genoma de Picornavirus y Expresión.  
<http://www.lehigh.edu/~jas0/PicornavirusGenome.gif>

## ENSAMBLE DE LA CÁPSIDE VIRAL.

Al estar siendo sintetizada la poliproteína va siendo procesada en 3 cortes primarios por sus propias proteasas virales internas 2Apro, 3Cpro y 3CDpro para producir proteínas precursoras P1-1a, P2-3b y P3-1b (1ABCD, 2ABC y 3 ABCD) que a su vez son procesadas, la primera es cortada a VP0, VP3 y VP1 que se unen para formar una procápside la cual se asocia al ARN viral e induce una alteración conformacional que la hace susceptible a una proteasa y da lugar a el virión maduro, ver figura 4 (Larsen, 1982). La demás proteínas precursoras son fragmentadas y producen proteínas implicadas en la síntesis del ARN viral y en la proteólisis del polipéptido viral: 2Apro, 3Cpro y 3CDpro, que son proteasas, 2BC, 2B, 2C, 3AB, 3A y 3B son proteínas necesarias para la replicación, 3Dpol es la ARN polimerasa y VPg (3B) proteína que se une al ARN y es necesaria para la replicación de ARN viral positivo y negativa (Wimmer, 1993).

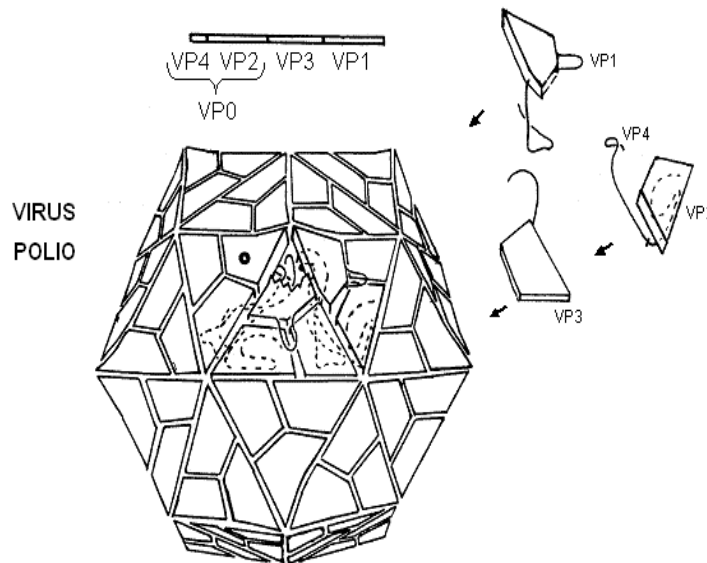


Figura 4. Ensamble de la cápside del virus de la polio. Las proteínas estructurales son procesadas desde un precursor para formar una procápside (VPO, VP3 y VP1). VPO se corta en VP2 y VP4 dando lugar al virión maduro. <http://www.microbes-edu.org/etudiant/virus.html>

## CICLO DE VIDA

El ciclo replicativo del virus es lítico y su receptor celular (hRPV o CD155) es una molécula perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se presenta en distintos órganos blanco, el sistema nervioso central, el

hígado o el intestino. Son resistentes a todos los antivíricos y quimioterapéuticos conocidos, y a la inactivación por solventes de lípidos.

Presentan una tendencia natural a la agregación espontánea que los protege del efecto de los agentes externos. Se inactivan rápidamente a más de 50°C, por la luz ultravioleta y en condiciones de desecación. Son estables a pH ácido. (Gendon, 1964; Evans, 1991).

Los 3 tipos de virus de la polio reconocen al mismo receptor celular. CD155 es una glicoproteína con ácido siálico, de más de 80kDa, unida a la membrana cuya región extracelular tiene 3 dominios tipo inmunoglobulina, D1, D2 y D3. (Koike, 1990; Koike, 1991) Todos los dominios presentan 8 sitios de glicosilación; existen 4 diferentes isotipos del receptor ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), en las cuales la secuencia de aminoácidos de los dominios extracelulares es idéntica.  $\beta$  y  $\gamma$  son secretados,  $\alpha$  y  $\delta$  están unidos a la membrana y sirven como receptor del virus de la polio, y difieren solo en la secuencia de su dominio citoplasmático carboxi-terminal (Koike, 1990). El análisis mutacional en el hPVR ayudo a determinar que el dominio V amino-terminal del mismo es esencial para permitir que las células sean infectadas por el poliovirus (Freistadt, 1991; Koike, 1991)

### **MECANISMO DE INFECCION**

El virus de la polio solo infecta al ser humano y algunos primates (chimpancés, gorilas, orangutanes y monos colobos) (Wolfe, 1998). El sitio primario de replicación del virus, en el humano, es en las capas de células epiteliales del intestino y tejidos oro faríngeos, la infección entonces inicia el estado linfático donde invade amígdalas y placas de Peyer's. Una minoría de virus viaja al sistema nervioso central (SNC) donde la replicación destruye a las neuronas motoras de la espina del asta anterior, causando el síndrome paralítico agudo, característico de la poliomiелitis (Solecki, 1998)

Los poliovirus infectan neuronas motoras y durante su multiplicación pueden destruirlas afectando principalmente a las células de las astas anteriores de la médula espinal, pero en casos severos también se ve afectada la sustancia gris, así como los cuernos posteriores y dorsales de la médula espinal. Las lesiones se encuentran a nivel del hipotálamo y del tálamo. En el cerebro los órganos más afectados son la formación reticular, el núcleo vestibular, el vermis cerebelar y el núcleo cerebelar profundo. Pueden presentarse cambios en las neuronas, que van desde una ligera cromatolisis

hasta una neuronofagia y total destrucción. (Destombes, 1997; Ford, 2002; Billings, 2005)

La entrada del virus a la célula requiere de un receptor en la membrana plasmática (PVR o CD55), lo que lleva a la endocitosis y se libera el ARN viral al citoplasma donde inicia la síntesis y el procesamiento de sus proteínas. También, se realiza la replicación del genoma viral y por último el empaquetamiento del mismo y la liberación de los viriones maduros (Figura 5).

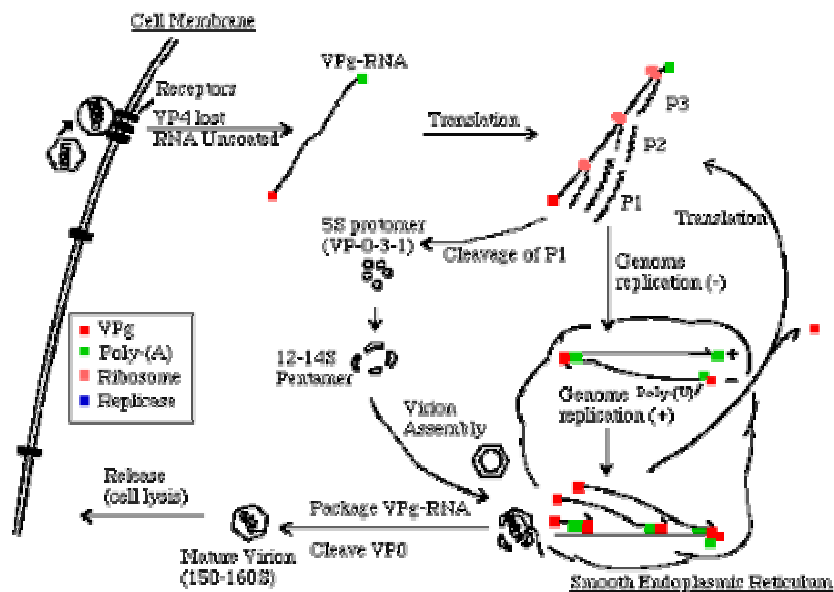


Figura 5. Síntesis y liberación del virus de la polio.

<http://www.microbiologybytes.com/virology/3035pics/Picorna2.gif>

Se transmite por contacto directo con las secreciones respiratorias, de garganta (el virus viaja con la tos y los estornudos) y las heces infectadas. Se han presentado contagios a través del consumo de agua o de alimentos contaminados o por lavado de manos inadecuado. Puede presentarse en forma endémica o en brotes epidémicos, siendo más frecuente en verano y otoño, en niveles socioeconómicos bajos y en lactantes y niños (más frecuente en varones). El hombre es el único reservorio conocido y la transmisión es por vía fecal-oral y respiratoria. (White, 1994; White, 1999; Wilson, 1991) Anteriormente los principales afectados por esta enfermedad eran los bebés y los niños, pero en la actualidad son más frecuentes los casos en personas mayores de 15 años y es más común durante el verano y el otoño

## **RESPUESTA INMUNE Y VACUNAS**

Existe un número de serotipos definidos por los epítomos de la cápside que se deben a modificaciones estructurales de la superficie del virión. Los epítomos antigénicos, que definen a cada serotipo, estimulan la formación de anticuerpos específicos que se comportan como neutralizantes de la infección, ya que no permiten su unión al receptor celular. La evolución de los serotipos sigue un proceso de deriva antigénica, en el que durante el proceso de copia del genoma se producen errores que introducen mutaciones puntuales. Estas mutaciones son acumulativas y modifican progresivamente la estructura de la cápside. (Evans, 1991).

Las vacunas para la poliomielitis empezaron a desarrollarse en 1949 cuando el bacteriólogo John Franklin *Enders* logró hacer crecer los virus en el laboratorio dentro de tejidos. Basándose en esa técnica el epidemiólogo Jonás *Salk* desarrolló la primera vacuna contra la poliomielitis de administración intramuscular a partir de los tres virus inactivados con formol. Tras las pruebas clínicas pertinentes que demostraron que era segura, en 1954 se empezó la inoculación. Posteriormente en 1964 *Sabin* y *Bougler* desarrollaron una vacuna de virus activos de administración oral. Se la llamó Trivalente porque atacaba a los tres virus. La inmunidad producida por la vacunación es predominantemente humoral (tipo TH1), específica de serotipo y duradera [los anticuerpos persisten durante toda la vida]. (Marshall, 1955; Salk<sub>a</sub>, 1955; Salk<sub>b</sub>, 1955; Hinman, 1988; Minor, 1996).

En diversos estudios se ha encontrado que la utilización de la vacuna de poliovirus inactivos (IPV) es capaz de inducir una fuerte respuesta de IgA de memoria en el suero. La vacunación IPV es suficiente para inducir una respuesta mucosa de IgA contra poliovirus y en los individuos sensibilizados con OPV mucosa, sin embargo, un refuerzo de la vacunación con IPV dirige a una fuerte respuesta de IgA en mucosas. (Herremans, 1999) Numerosos estudios han mencionado un papel para las células T en la inmunidad contra los poliovirus a través de su función colaboradora en la producción de anticuerpos.

## **PROPIEDADES INMUNOGÉNICAS DE LAS PROTEÍNAS VP1, VP2 Y VP4.**

La mayoría de la información acerca de los determinantes antigénicos involucrados en la neutralización de los poliovirus ha derivado de estudios utilizando

anticuerpos monoclonales generados por ratones inmunizados vía parenteral. Muchos estudios han sido llevados a cabo para definir las estructuras antigénicas involucradas en la neutralización de los poliovirus y han resultado en la identificación de varios epítopes de neutralización. Los cuatro sitios antigénicos principales para la neutralización han sido identificados en las 3 proteínas principales de la cápside de los tres serotipos de poliovirus. El sitio 1 está compuesto de residuos de VP1, mientras las estructuras de los otros sitios antigénicos parecen ser más complejas, involucrando residuos de VP1, VP2, y/o VP3. (Fiore, 1997).

El análisis específico contra las proteínas purificadas de los virus de la polio demuestra que clones de las células T reconocen epítopes en las proteínas de la superficie de la cápside VP1, VP2, VP3 y de la proteína interna de la cápside VP4. Definiendo 4 epítopes en el extremo amino-terminal de VP4, entre los residuos 6 y 35, estos son altamente conservados entre los 3 tipos de virus e inducen reactividad cruzada. Además se identificaron 3 epítopes en VP3, residuos 14-28, 189-203 y 196 a 210 del primero, y 1 en VP1, residuos 257-264 de la región variable de VP1; y que la sustitución simple o múltiple de estos aminoácidos afecta el reconocimiento de estos epítopes por parte de las clonas (Mahon, 1992).

La caracterización inmunológica de los linfocitos T específicos de poliovirus indica que la población efectora involucrada en la respuesta proliferativa específica observada fue de las células T colaboradoras CD4<sup>+</sup>. Esta respuesta fue inducida por estimulación con la proteína VP1 o con péptidos sintéticos de la misma y se identificaron varios epítopes en 3 regiones de la proteína VP1, residuos 7-24, 86-120 y 201-241; que fueron reconocidos por células T de ratones BALB/c (H-2<sup>d</sup>), C57Bl/6 8H-2<sup>b</sup>) y C3H/HeJ (H-2<sup>k</sup>). Dentro de la primera región también se detectaron dos regiones más de reconocimiento, residuos 86-103 y 110-120. Todos se localizan cerca de sitios de unión a anticuerpos e inducen respuesta proliferativa de células T (Kutubuddin<sub>a</sub>, 1992). Por otro lado, la inmunización de ratones BALB/c byJ (H-2<sup>d</sup>) con el poliovirus tipo 1 o la proteína VP1 purificada inducen respuesta de linfocitos T citotóxicos y con la ayuda de vectores que expresaban segmentos de VP1 o péptidos sintéticos se identificaron dos epítopes de linfocitos T citotóxicos en VP1, residuos 110-120 y 202-221, asociados a moléculas de MHC clase I (D<sup>d</sup> o K<sup>d</sup>); estos epítopes se encuentran localizados cerca de sitios antigénicos neutralizantes y son capaces de inducir respuesta de linfocitos T citotóxicos (Kutubuddin<sub>b</sub>, 1992). Un epítope dominante para las células T fue identificado en la región de los aminoácidos 103-115 de VP1 de la



cápside, muy cerca del epítotope de neutralización C3, restringido a H-2<sup>d</sup>. La inmunización de ratones BALB/c (H-2<sup>d</sup>) con el péptido p86-115, que contiene tanto el epítotope de las células T como el epítotope de neutralización C3, induce respuesta de células T CD4<sup>+</sup> y células B específicas de poliovirus (Leclerc, 1991).

Como se sabe, el poliovirus solo infecta al hombre y algunos primates (chimpancés, gorilas, orangutanes y monos colobos) (Wolfe, 1998). Sin embargo, la infección por poliovirus puede ser inducida en ratones transgénicos que expresan el receptor para el poliovirus (Koike, 1993; Crotty, 2002; Buisman, 2003). Pero existen estudios que determinaron la inducción de una respuesta inmune contra el poliovirus en diferentes cepas de ratones hembras no transgénicas para el receptor del poliovirus (Leclerc, 1991; Katrak, 1991; Mahon, 1992; Kutubuddin, 1992<sup>a</sup>; Kutubuddin 1992<sup>b</sup>; Fiore, 1997).

Debido a los antecedentes descritos en la introducción nos permite proponer que si los antígenos del virus de la polio que indujeron la respuesta de memoria fueran expresados en células tumorales de individuos que recibieron durante su infancia la vacuna oral anti-poliomielítica se esperaría una activación de tal respuesta, principalmente una respuesta de linfocitos T citotóxicos, y que ésta podría conducir a un reconocimiento y ataque específico de las células tumorales que expresen dichos antígenos. Una de las formas en que teóricamente se puede lograr la expresión de antígenos en una célula tumoral es a través de su transfección *in vivo* con vectores plasmídicos de ADN que contengan las secuencias que codifican para tales antígenos. Interesantemente, se han desarrollado vectores plasmídicos que contienen secuencias que permiten el transporte y anclaje en la membrana de los productos génicos de interés. Esto representa un potencial interesante de aplicación en la terapia génica del cáncer.

Debido a lo anterior, en este trabajo proponemos la clonación de los genes que codifican para las proteínas de la cápside del virus de la polio en vectores de expresión, y su uso para la transfección de células de tumores de melanoma que se inducirán en ratones que hayan sido vacunados contra la polio, y evaluar su potencial para el desarrollo de una respuesta de memoria contra dichos tumores.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Determinar la eficiencia de transfección de los plásmidos que expresan los genes que codifican para las proteínas de la cápside del virus de polio (VP1, VP2 y VP4) en células de melanoma de ratones inmunizados contra la polio y el efecto en el crecimiento tumoral de la expresión de las proteínas virales en las masas tumorales.

### **Objetivos específicos**

1. Clonar los genes VP1, VP2 y VP4 en el vector pDISPLAY para su expresión en células de mamífero.
2. Caracterizar los plásmidos construidos por restricción enzimática, PCR y secuenciación.
3. Inmunizar ratones de la cepa C57Bl/6 (4-6 semanas de edad) con la vacuna oral anti-poliomielítica.
4. Determinar si la inmunización en los ratones induce anticuerpos contra el poliovirus.
5. Inducir tumores de piel en los ratones vacunados con la línea singénica de melanoma B16FO.
6. Inocular los tumores con los plásmidos construidos y evaluar su efecto en el crecimiento tumoral.
7. Determinar la presencia de los plásmidos inoculados en las células tumorales.
8. Evaluar la expresión de los genes clonados en células de tumores inoculados con los plásmidos por PCR y WB.

## **HIPÓTESIS**

La expresión in vivo de las proteínas VP1, VP2 y VP4 de la cápside del virus de la polio en tumores de piel de ratones previamente inmunizados contra la polio, inducirá una respuesta inmune de memoria contra las células tumorales que expresan las proteínas virales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Plásmidos**

El plásmido pDISPLAY fue obtenido de Invitrogen (Invitrogen Life Technologies). El plásmido pXpA fue donado por el Dr. Raúl Andino, Departamento de Inmunología y Microbiología, Universidad de California, San Francisco (UCSF), USA. El plásmido pXpA contiene el ADNc completo del virus de la polio silvestre tipo 1 de la cepa Mahoney.

### **Células**

Las células B16FO fueron derivadas de un melanoma de ratón C57BL/6J (haplotipo H-2<sup>b</sup>). Las células HeLa fueron derivadas de un cáncer cervical humano asociado a VPH tipo 18, fueron crecidas y mantenidas en Medio Eagle Modificado por Dubelcco (DMEM) (In vitro S. A de C. V) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, Life Technologies) y 100U/ml de la mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina en solución salina de NaCl al 0.85%, In Vitro). Las células fueron crecidas a 37°C en una atmósfera con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Cuando las monocapas alcanzaron el 90% de confluencia fueron subcultivadas utilizando tripsina al 0.75% (Gibco BRL) en PBS.

### **Virus**

El virus de la polio fue obtenido directamente de la vacuna anti-poliomielítica fabricada por Laboratorios Birmex S. A de C. V. La vacuna anti-poliomielítica contiene los siguientes títulos de los tres serotipos de virus humanos 1x10<sup>6</sup> partículas virales del tipo I, 1x10<sup>5</sup> partículas virales del tipo II y 6x10<sup>5</sup> partículas virales del tipo III.

### **Animales**

La cepa C57BL/6J {H-2<sup>b</sup>} fue obtenida del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ratones de 4 a 6 semanas de edad fueron utilizados en los experimentos. Los ratones fueron mantenidos en cajas de microaislamiento con comida y agua *ad limitum*.

## **PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO (PROCEDIMIENTO DE MINIPREPARACIÓN), MEDIANTE LISIS ALCALINA**

5ml de medio LB (Apéndice 1) con 25µl de ampicilina (50mg/ml) fueron inoculados con una asada de bacterias *E. coli* recombinantes. Se incubó a 37°C, durante toda la noche, con agitación constante a 250rpm. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 5000g durante 8 min. Los botones bacterianos se resuspendieron en 200µl de solución I [50mM glucosa, 25mM TRIS-HCL (pH 8.0), 10mM EDTA (pH: 8.0)], a la cual se adicionó 0.005gr de lisozima sólida, para favorecer la lisis celular. Se mezcló por agitación invirtiendo los tubos 5 veces y se incubaron en hielo durante 5 min. Se adicionó 400µl de solución II (0.2M NaOH 1% SDS), e inmediatamente se mezcló su contenido invirtiendo los tubos rápidamente.

Para precipitar las proteínas y el ADN genómico, se adicionaron 300µl de solución III (5M acetato de potasio pH: 5) a cada tubo; para dispersar el acetato de potasio se removieron los tubos fuerte y rápidamente, hasta que se observó un lisado viscoso; los tubos fueron incubados en hielo durante 10 min, para después centrifugar a 12000g durante 5 min más. El sobrenadante que contenía el plásmido se transfirió a tubos nuevos y estériles y se les adicionó 500µl de isopropanol y se incubaron en hielo durante 10 min. Los tubos se centrifugaron a 12000g durante 5 min, el sobrenadante se desechó y los botones se resuspendieron en una mezcla de 200µl de Buffer TE (Apéndice 2) complementado con 100µl de solución IV (7.5 M de acetato de amonio) por tubo. Para precipitar el ARN, los tubos se incubaron en hielo durante 20 min y se centrifugaron a 12000g durante 5 min; el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos. Posteriormente se adicionaron 600µl de etanol al 95 %, se mezclaron por agitación y los tubos se incubaron a -70°C durante 1 hora. Después de la incubación, los tubos se centrifugaron a 1200g durante 15 min. Y los botones resultantes se resuspendieron en 30µl de H<sub>2</sub>O ultra pura guardándose a -20°C hasta su uso posterior.

### **RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA.**

El ADN fue digerido con endonucleasas de restricción en el buffer correspondiente 10X acorde a las instrucciones del fabricante. En general se usó una unidad de enzima para digerir 1µg de ADN a 37°C, toda la noche. La reacción de restricción fue analizada por electroforesis en geles de agarosa.

## **ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.**

Los geles de agarosa fueron preparados disolviendo la concentración requerida de agarosa en TBE/bromuro de etidio [10µg/ml] (Apéndice 3). Para disolver la agarosa la mezcla fue calentada usando un horno de microondas, hasta que la agarosa estuviese completamente disuelta. La solución fue vertida en una base para geles, colocando el peine para la formación de pozos, permitiendo que la solución gelificara. Las muestras de ADN para el análisis fueron diluidas con buffer de carga (Apéndice 4) y cargadas en los pozos del gel; en un pozo adjunto se cargó 2µl (100ng) de marcador de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo a 100v por 45 minutos. La presencia de las bandas de ADN fue detectada por iluminación UV usando un transiluminador (Foto/Analist Visionary) y fotografiado usando un documentador de geles (Fotodine/Mitsubishi).

## **ELECTROELUSIÓN DEL ADN**

Con el fin de purificar bandas de ADN de tamaños específicos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Después de 45 min de corrimiento electroforético, la banda de interés fue extraída del gel con un bisturí y se colocó en una membrana de diálisis, a la que se adicionó 1ml de buffer de Electroelusión [TAE] (Apéndice 5).

El ADN se aisló de la agarosa, por medio de un nuevo corrimiento electroforético a 100 Volts durante 30 min. Después de este tiempo, la membrana fue observada en el transiluminador, en donde se pudo verificar que el ADN se encontraba en el buffer de Electroelusión y no en la agarosa. El ADN se purificó usando la técnica de extracción con fenol-cloroformo y precipitación por etanol.

## **PURIFICACIÓN DE ADN POR EXTRACCIÓN CON FENOL-CLOROFORMO Y PRECIPITACIÓN POR ETANOL (Modificación de Maniatis et. al, (1989))**

En un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1), se adicionó la muestra de ADN en un tubo de polipropileno. El contenido del tubo se agitó hasta que se formó una emulsión y los tubos se centrifugaron a 12 000g durante 5 min. El ácido nucleico contenido en la fase acuosa que se formó en la parte superior, se transfirió a un tubo nuevo y limpio con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y las fases se mezclaron agitando los tubos y posteriormente centrifugando a 12000g durante 10 seg. El ADN contenido en la fase acuosa (fase superior) se transfirió a un tubo nuevo y

limpio. El ADN se precipitó con 750 $\mu$ l de etanol al 95%. El contenido se mezcló rápidamente por inversión de los tubos de 4 a 5 veces y posteriormente se incubaron a -70°C durante 1 h. El ADN se centrifugó a 12000g durante 15 min. Se decantó el sobrenadante y los botones se resuspendieron en agua ultrapura.

### **PURIFICACIÓN DE ADN POR CONGELACIÓN**

Se cortaron las bandas de ADN a partir de un gel de agarosa. Los fragmentos se transfirieron a tubos falcón estériles de 15ml y se incubaron a -20°C toda la noche. El líquido condensado se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y estéril, se agregó un volumen de acetato de amonio 7.5M, los tubos se agitaron en un vortex por 15 seg y se adicionó un volumen de etanol absoluto frío, se agitaron de nuevo por 15 seg en un vortex y se incubaron a -20°C toda la noche. Posteriormente se centrifugaron a 13000rpm durante 30 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el botón se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó a 13000rpm durante 30 min a 4°C, se decantó sobrenadante y el botón se dejó secando sobre papel. Una vez eliminados los residuos de etanol, el botón se resuspendió con agua ultra pura.

### **REACCIONES DE LIGACIÓN**

La reacción de ligación enzimática se realizó como sigue:  
Antes de la ligación entre el inserto de ADN y el vector, éstos fueron preparados por restricción enzimática, descrita anteriormente. La ligación del vector e inserto de ADN se llevó a cabo en 20 $\mu$ l de volumen de ligación, con un ratio de 1:3 (vector-inserto) usando 100ng del vector digerido. Para la reacción de ligación se usó 1U de T4 ADN ligasa (1U/ $\mu$ l, Gibco BRL®), buffer de ligación 5X y agua ultrapura. La mezcla de reacción fue incubada a 16°C toda la noche. Estas ligaciones fueron usadas para transformar células JM101 competentes.

### **TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.**

La alícuota de células competentes fue descongelada en hielo. 100 $\mu$ l (1000 células aproximadamente) de ésta fue incubada con 10 $\mu$ l de la reacción de ligación, en condiciones de esterilidad. Las muestras se incubaron en hielo durante 30 min y posteriormente se aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 min. Inmediatamente después se adicionaron 500 $\mu$ l de medio LB y los tubos fueron incubados 1 h a 37°C

con agitación constante. Después de la incubación, se colocó 300µl del volumen total de la mezcla en una caja Petri con LB-agar bacteriológico más 20µl de ampicilina (100mg/ml), para luego dispersarlo por toda la superficie de la caja. La caja de Petri se incubó a 37°C durante toda la noche en posición invertida. Una vez obtenidas las colonias, se colectaron 10 colonias y se usaron para inocular tubos con 5ml de medio LB con ampicilina (100mg/ml). Los tubos se incubaron a 37°C con agitación constante a 250rpm, toda la noche. Posteriormente se tomó una gota de cada cultivo y se colocó en una caja con LB-agar. Se incubó a 37°C toda la noche, se selló con parafilm y se guardó a 4°C para su uso posterior.

### **AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS CODIFICADORAS DE LAS PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS POR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION).**

El Marco de Lectura Abierto de interés (secuencias génicas VP1, VP2 y VP4) fue amplificado por PCR utilizando 2 unidades de *Taq* DNA polimerasa (PerKin Elmer), 2µl de buffer PCR 10X, 25mM de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 10µM de cada uno de los oligonucleótidos, 2mM de dNTPs y 1µl de ADN plasmídico, previamente aislado. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20µl, utilizando los siguientes oligonucleótidos:

VP1 F/*BamH I* (5' C GAA TTC ATG GGG TTA GGT CAG 3') y VP1 R/*Xho I* (5' C CTC GAG GTG TCC GAA TCC ATA 3') que amplifican una región de 917 pares de bases correspondientes al gen VP1 completo.

VP2 F/*BamH I* (5' C GAA TTC GCC CCA ATG CTA AAC 3') y VP2 R/*Xho I* (5' C CTC GAG GCC CTG TAA GCG TGG 3') que amplifican una región de 833 pares de bases correspondientes al gen VP2 completo.

VP4 F/*BamH I* (5' C GAA TTC ATG GGT GCT CAG GTT 3') y VP4 R/*Xho I* (5' C CTC GAG GTT TAG CAT TGG GGC 3') que amplifican una región de 204 pares de bases correspondientes al gen VP4 completo.

Como control positivo en todos los ensayos de PCR, se utilizó el plásmido pXpA. La amplificación se llevó a cabo en 30 ciclos de 95°C-30 segundos, 40°C-60 segundos, 72°C-90 segundos. Se usó un termociclador Perkin Elmer, modelo 9600.



## **STOCK EN GLICEROL DE CÉLULAS BACTERIANAS TRANSFORMADAS**

Una vez confirmada la positividad de las colonias recombinantes mediante restricción enzimática y reacción de PCR, se hizo un stock en glicerol de las colonias seleccionadas. Para ello se utilizaron tubos de crioconservación en los que se colocaron 850µl de células transformadas y 150µl de glicerol estéril; se almacenaron a -70°C hasta el momento de su uso.

## **PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR CROMATOGRFÍA.**

Para el análisis de secuenciación se utilizó ADN plasmídico aislado por el kit Miniprep Spin de QIAprep de QIAGEN, usando las soluciones del proveedor, como se describe a continuación: Se partió de un cultivo bacteriano de 1.5ml de medio LB selectivo crecido toda la noche a 37°C en agitación constante. El cultivo se centrifugó a 13000rpm durante 1 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 250µl de Buffer P1, posteriormente se adicionaron 250µl del Buffer P2 y mezcló suavemente por agitación invertida 4-6 veces. Se agregó 350µl del Buffer N3 e inmediatamente se mezcló por agitación invertida pero suavemente de 4-6 veces. Se centrifugó por 10 min a 13000rpm. Se transfirió el sobrenadante a la columna spin de QIAprep y se centrifugó a 13000rpm durante 1 min. Posteriormente se lavó la columna adicionando 0.75ml de Buffer PE, se transfirió la columna a un tubo eppendorf nuevo y se centrifugó por 1 min a 13000rpm. Se traspasó la columna a un nuevo tubo y se adicionó 50µl del Buffer EB, se esperó 1 minuto para eluir el ADN y se centrifugó por 1 minuto a 13000rpm. El ADN obtenido se guardó hasta su uso.

## **REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN**

Los genes que codifican para las proteínas de la cápside del virus de la polio clonadas en el vector de expresión pDISPLAY fueron analizadas mediante una secuenciación automática del inserto.

Para VP1 se usó el siguiente oligonucleótido en el extremo 5' *F/BamH I*: **C GAA TTC ATG GGG TTA GGT CAG**. Y en el extremo 3' se usó el oligonucleótido *R/Xho I*: **C CTC GAG GTG TCC GAA TCC ATA**.

Para VP2 se usó el oligonucleótido *F/BamH I*: **C GAA TTC GCC CCA ATG CTA AAC** en el extremo 5' y en el extremo 3' se usó el oligonucleótido *R/Xho I*: **C CTC GAG GCC CTG TAA GCG TGG**.

Para VP4, en el extremo 5' se usó el oligonucleótido *F/BamH I C GAA TTC ATG GGT GCT CAG* y en el extremo 3' se usó el siguiente oligonucleótido *R/Xho I C CTC GAG GTT TAG CAT TGG GGC*.

Se utilizó el kit Dye Deoxy Terminator cycle sequencing (Perkin Elmer), bajo las siguientes condiciones: 94°C/5min; 94°C/30s; 55°C/30s; 60°C/10s; 60°C/5min.) 35 ciclos. La lectura del producto amplificado se realizó en el secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkir Elmer, modelo 3100, Versión 3.7). La secuenciación fue analizada por alineamiento con el programa Clustal X.

## **INDUCCIÓN DE TUMORES**

5x10<sup>5</sup> células B16FO fueron inyectadas intradérmicamente en el costado derecho de cada animal. La inducción de los tumores se llevó a cabo 2 semanas después de que los animales fueron vacunados contra la polio. El desarrollo de los tumores fue monitoreado cada dos días.

## **TRATAMIENTO DE TUMORES**

Cuando los tumores alcanzaron un área de 1.0mm<sup>2</sup> se realizó su tratamiento. Los tumores fueron inyectados directamente con 100µg pDISVP1 y pDISVP4 o 300µg de pDISVP1, 300µg de pDISVP2 y 300µg de pDISVP4, utilizando para este fin una jeringa de tuberculina y procurando depositar los plásmidos en el centro de la tumoración.

Grupos de animales recibieron 100µg ó 300µg de los plásmidos pVAXVP1, pVAXVP2 y pVAXVP4, los cuales expresan a VP1, VP2 y VP4 pero no las presentan en la membrana celular. Otros grupos de animales recibieron 100µg ó 300µg del plásmido pDISPLAY y pVAX vacío respectivamente. Finalmente un último grupo de animales fue dejado sin tratar.

## **OBTENCIÓN DE BIOPSIAS DE TUMORES**

Cuando los tumores tenían 7-10 días de crecimiento se sacrificaron los animales. Se obtuvieron biopsias de todos los tumores y se guardaron en nitrógeno líquido en crioviales hasta su uso.

## **EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS BIOPSIAS.**

Se tomaron muestras de todas biopsias, se cortaron finamente, se colocaron en tubos eppendorf nuevos y se adicionaron 400µl de buffer de digestión (Apéndice 9) y 10µl de Proteinasa K (Invitrogen) a cada tubo, se incubaron a 55°C por 5h con agitación cada 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 5000rpm por 5 min, el sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf nuevos y se limpiaron 3 veces con Buffer Ultrapuro de fenol saturado (Invitrogen), invirtiendo los tubos rápidamente para mezclar el contenido. Posteriormente se centrifugaron 5 min a 13000rpm y se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos. Una vez limpios, se adicionó etanol al 95% a cada tubo, se agitaron y se incubaron 1h a -70°C. Por último, se centrifugaron 15 min a 13000rpm, se decantó el sobrenadante, se retiró el exceso y los botones resultantes se resuspendieron en 100µl de agua ultra guardándose a -20°C hasta su uso.

## **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DE LAS BIOPSIAS**

Para extraer proteína total, se obtuvieron muestras de las biopsias, se cortaron finamente y se les adicionó 500µl de buffer de Lisis (Apéndice 10) y 5µl de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche), se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente se rompieron las paredes celulares de las células utilizando un sonicador soniprep 150 (SANYO), las muestras se sonicaron tres veces, durante 1 min a potencia media (7µicrons) con intermedios de medio min, hasta visualizar el tejido disgregado totalmente. Una vez disgregadas todas las muestras se centrifugaron 10min a 13000rpm a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, se tomaron 20µl de cada muestra y se colocaron en tubos eppendorf nuevos. El resto se guardó a -20°C hasta su uso. Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de la proteína total utilizando el ensayo de proteína DC (Bio Rad) y leyendo a 750nm en un Espectrofotómetro Spectronic 21D (Milton Roy).

## **WESTERN BLOT**

Se obtuvieron las proteínas totales de células tumorales transfectadas y no transfectadas con los plásmidos. Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos a 24h, 48h y a los 15 días del tratamiento.

Los extractos de proteínas fueron incubadas con solución de carga (Invitrogen) (Apéndice 11), durante 5 min a 100°C. Las muestras fueron separadas por corrimiento

electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Apéndice 12) al 10% a 95V por 45 minutos. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 120V durante 1 h a 4°C en una cámara Mini-VE Hoefer (Amserham Biosciences) en buffer de corrida 1x {3% (w/v) tris-base, 14% (w/v) glicina, 5% SDS al 20%} diluido 1:10. Luego la membrana fue incubada con solución bloqueadora [5% leche descremada en polvo, 0.1 % Tween-20 en PBS] durante toda la noche a 4°C. Posteriormente la membrana fue lavada tres veces durante 5 min con 0.1% Tween-20 en PBS. Después la membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal, comercial anti-virus de la polio, isotipos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub>, (Chemicon Internacional) diluido 1 en 100 en PBS -BSA 1%- Tween 0.05%. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente, la membrana fue lavada tres veces durante cinco minutos con 0.1% Tween-20 en PBS. En seguida, la membrana se incubó el anticuerpo policlonal de cerdo  $\alpha$ -ratón,  $\alpha$ -cabra,  $\alpha$ -conejo IgG multi-unión acoplada a biotina (Dako) diluido 1:250 en PBS-BSA 1%-Tween 0.05%. Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente, las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 min con 0.1% Tween-20 en PBS. Posteriormente se adicionó estreptavidina acoplada a peroxidasa (Dako) en una dilución 1:250 en PBS-BSA 1%-Tween 0.05%. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la membrana fue lavada tres veces durante 5 min con 0.1% Tween-20 en PBS. Finalmente la membrana fue expuesta al agente quimioluminiscente luminol (Perkin Elmer) durante 1 min y fueron reveladas.

### **INMUNIZACIÓN DE ANIMALES CON LA VACUNA ORAL ANTI-POLIOMIELÍTICA**

Un grupo de ratones hembra C57Bl/6 fueron inmunizados con la vacuna Sabin por la vía oral. Otro grupo de ratones hembra recibieron solución salina estéril (PBS) (Apéndice 6) por la misma vía, utilizando una sonda intragástrica. Los animales recibieron 3 dosis de 100 $\mu$ l de la vacuna Sabin (500 partículas virales del tipo 1, 50 partículas virales del tipo 2 y 300 partículas virales del tipo 3) o de la solución salina estéril a intervalos de 2 semanas.

### **OBTENCIÓN DE SUEROS**

Las muestras de sangre se obtuvieron de todos los ratones, tanto inmunizados como no inmunizados, por vía retro-orbital y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 estériles y se pusieron en hielo. Posteriormente se incubaron por 45min a 4°C, se quitaron los coágulos a cada muestra con un palillo estéril y se centrifugaron a 4°C por

15min a 13000rpm y se transfirió el sobrenadante (suero) a un tubo eppendorf nuevo estéril guardándose a -20°C hasta su uso.

### **ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.**

Diferentes números de células HeLa se sembraron en una placa de 96 pozos estéril y se incubaron por 2 h a 37°C con 200µl de medio DMEM suplementado y posteriormente se hizo el ensayo de MTT (Apéndice 7) como sigue: se lavaron las células tres veces con 200µl de medio DMEM sin suero, posteriormente se adicionaron 200µl de medio DMEM suplementado y 50µl de MTT [1mg/ml en PBS], se resuspendió y se incubó 1 h a 37°C. Se eliminó el medio y se lavaron las células tres veces con 200µl de medio DMEM suplementado, se adicionó 100µl de isopropanol, resuspendiendo hasta disolver los cristales formados. Posteriormente se leyó la absorbancia a 570nm en un lector de ELISA (BIOC-T EK ELx800).

### **CULTIVO DE VIRUS DE LA POLIO**

$5 \times 10^5$  células HeLa fueron sembradas en cajas de cultivo p100 estériles con 8ml de medio DMEM suplementado y crecidas a 37°C. Cuando las monocapas alcanzaron el 80% de confluencia fueron infectadas con 1ml de la vacuna oral ( $5 \times 10^5$  partículas virales del tipo 1,  $5 \times 10^4$  partículas virales del tipo 2 y  $3 \times 10^5$  partículas virales del tipo 3), 24h después se transfirió 1ml del medio de las células infectadas a una nueva caja de células con 80% de confluencia. Esto se repitió 10 veces para mantener activo al virus. De este cultivo se obtuvo el virus para los ensayos siguientes.

### **ENSAYO DE INFECCIÓN *in vitro* DE CÉLULAS HeLa POR POLIOVIRUS.**

#### **DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL<sub>50</sub>) Y LA DOSIS LETAL 100 (DL<sub>100</sub>).**

$1 \times 10^5$  células HeLa se sembraron en pozos de placas de 96 pozos estériles y se incubaron por 2 h a 37°C (5% CO<sub>2</sub>), posteriormente se eliminó el medio y se adicionaron diluciones de la vacuna anti-poliomielítica (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:125, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:4000) y se incubaron toda la noche a 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Al día siguiente se cuantificó el número de células vivas por el ensayo de MTT antes descrito.

## **ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA INFECCIÓN POR POLIOVIRUS.**

**DÍA 1:** Los sueros de ratones vacunados y no vacunados fueron incubados con de 50 µl de virus de la polio en cultivo a 4°C por 24 h.

**DÍA 2:**  $1 \times 10^5$  células HeLa se sembraron en placas de 96 pozos estériles y se incubaron 2 h a 37°C (5% CO<sub>2</sub>), posteriormente se eliminó el medio. Se adicionaron las muestras preparadas el día 1 y se incubaron por 24 h a 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Al día siguiente se realizó el ensayo de MTT antes descrito.

## **INMUNOCITOQUIMICA DE CÉLULAS INFECTADAS CON VIRUS DE LA POLIO.**

Los reactivos utilizados excepto los anticuerpos, se obtuvieron del Kit Histostain –DS (Zymed).

$5 \times 10^5$  células HeLa fueron sembradas en una caja p25 estéril y se incubaron 2 h a 37°C (5% CO<sub>2</sub>), posteriormente se eliminó el medio, se adicionaron 1ml de medio DMEM nuevo y 100µl de virus de la polio en cultivo y fueron incubadas a 37°C por 24h, después se les retiró el medio. Posteriormente las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS y fueron fijadas con 1ml de metanol frío por 10 min a 4°C; se retiró el metanol y posteriormente se le adicionó peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% en metanol por 10 min a temperatura ambiente. Las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS y fueron incubadas con 800 µl de Suero Fetal Bovino 1:4 en TBS-BSA 2% -Tween 0.1% (Apéndice 8) y se dejó incubando por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó el anticuerpo monoclonal comercial anti-virus de la polio (clonas 583-G8-G2-A4, 591-B1-H7-D1 y 613-F1-B5-E5), isotipos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub>, (Chemicon Internacional) que reconoce a los tres tipos de virus, dilución 1:100 en solución bloqueadora (TBS-BSA 2% -Tween 0.1%) o sueros de ratones no inmunizados o inmunizados con la vacuna anti-poliomielítica, dilución 1:100 en solución bloqueadora. Se incubó por 2 h a 37 °C.

Posteriormente se lavó 2 veces con PBS y se adicionó el anticuerpo policlonal de cerdo α-ratón, α-cabra, α-conejo IgG multi-unión acoplada a biotina (Dako) (dilución 1:100); se incubó 1 h a temperatura ambiente y se lavó 2 veces con PBS y se añadió estreptavidina-HRP diluida 1:100 en solución bloqueadora, y se dejó incubando 1 h a temperatura ambiente. Se lavó 6 veces con PBS y se añadió 20µl de sustrato AEC (3-Amino-9-etil-carbazol) y 1250µl del Buffer para el sustrato AEC, para revelar la señal del anticuerpo secundario. Se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Se lavó con

agua-destilada y finalmente las monocapas fueron contrateñidas con una gota de hematoxilina por 1 min, se lavó con agua, y se fijó con el medio de montaje COVER care (Biocare Medical).

### ***ANÁLISIS ESTADÍSTICO***

Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba t de Student. Se consideró un nivel de significancia básico para  $p=0.05$  con un intervalo de confianza de 95%.

## **RESULTADOS**

### **CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4.**

#### **Clonación de los genes VP1, VP2, VP4 en el vector de expresión pDISPLAY.**

En el presente proyecto las secuencias génicas que codifican para VP1, VP2 y VP4 del virus de la polio fueron clonadas en el vector de expresión pDISPLAY, para dar lugar a los plásmidos pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4.

Este vector tiene las siguientes características: contiene el promotor de Citomegalovirus humano (pCMV) que permite la expresión del gen de interés en células de mamífero. Además contiene la secuencia de la cadena- $\kappa$  de Ig de la V-J2-C murina que funciona como péptido señal, el cual induce el transporte de la proteína clonada a la membrana. Por último presenta una secuencia que codifica para el dominio transmembranal del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-TM) que conlleva al anclaje de la proteína de interés en la membrana, lo cual permitirá que esté expuesta al reconocimiento.

Se seleccionaron cinco colonias de bacterias transformadas con pDISVP1, se extrajo el ADN y se analizó por restricción con la enzima de restricción *Xba* I. Esta enzima corta al inserto (VP1), en los sitios 2546 y 2861 y no corta al vector, por lo que se espera obtener dos fragmentos de aproximadamente 315 y 6000pb, los cuales se observaron en todas las colonias. Para corroborar la presencia de la secuencia génica VP1 en el plásmido, se seleccionaron 2 colonias y se realizó un análisis por PCR, usando los oligonucleótidos VP1F Y VP1 R mencionados en la metodología.



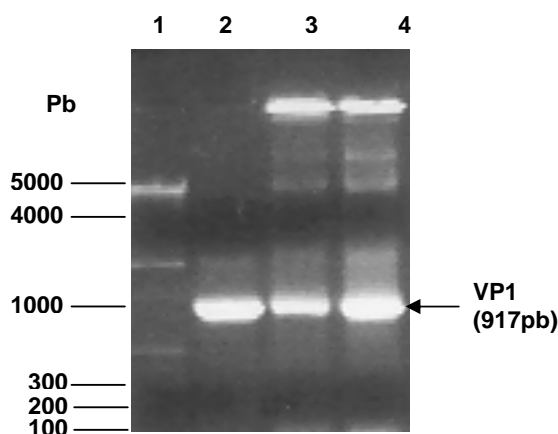


Figura 6. Amplificación del gen VP1 del virus de la polio por PCR. El gen VP1 fue amplificado usando los oligonucleótidos VP1F y VP1R. Los productos de la reacción fueron analizados en un gel de agarosa al 1%. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular; 2.- control positivo; 3.- ADN de la colonia 1; 4.- ADN de la colonia 2.

En la Figura 6 se muestra el resultado de la PCR; como control positivo en todos los ensayos de PCR, se utilizó el plásmido pXpA, que contiene el cDNA completo del virus de la polio tipo 1 (cepa Mahoney). Como se puede apreciar la PCR produjo una banda en las colonias seleccionadas del mismo peso molecular que el que se observa en el control positivo, y que corresponde al mismo peso esperado para VP1 (917pb). Por otro lado, en el control negativo que sólo contenía agua en lugar de ADN templado, no se observó amplificación. Estos resultados muestran que el gen VP1 fue clonado exitosamente en el vector pDISPLAY.

Por otro lado, 4 colonias de bacterias transformadas con pDISVP2, fueron analizadas por restricción con la enzima *Ssp* I. Esta enzima corta tanto al inserto (VP2) en el sitio 1641 como al vector pDISPLAY en dos sitios (4754, 5307), por lo que se esperan tres fragmentos génicos de 4005, 1582 y 553pb. Al observar las muestras en el gel de agarosa se visualizaron los tres fragmentos esperados en dos colonias. Para corroborar la presencia de la secuencia génica VP2 en el plásmido, en las dos colonias, se llevó a cabo un ensayo de PCR, usando los oligonucleótidos VP2F Y VP2R.

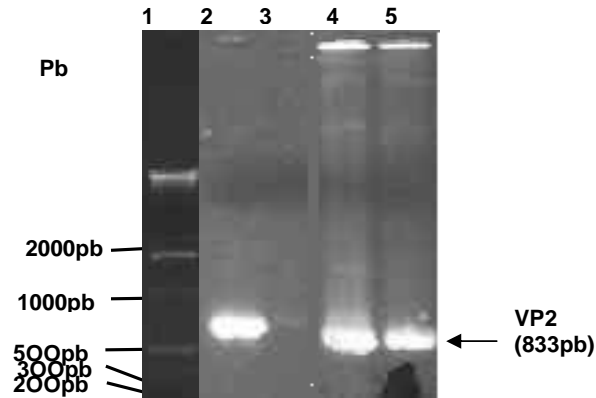


Figura 7. Análisis de la presencia del gen VP2 del virus de la polio por PCR. El ADN de 2 colonias seleccionadas fue amplificado usando los oligonucleótidos VP2 F y VP2 R. El producto de la reacción fue analizado en un gel de agarosa al 1%. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular; 2.- control positivo; 3.- control negativo; 4.- ADN de la colonia 1; 5.- ADN de la colonia 2.

Como se puede observar en la Figura 7, la reacción de PCR produjo un amplificado en las 2 colonias seleccionadas del mismo peso al que se observa en el control positivo, y que corresponde al peso esperado para VP2 (833pb). Estos resultados muestran que el gen VP2 fue clonado atinadamente en el vector pDISPLAY.

Para el caso de pDISVP4, se seleccionaron tres colonias, se extrajo el ADN y se analizaron por restricción con la enzima *Sma* I. Esta enzima corta al vector pDISPLAY en un sitio único (815) dentro de la región de policlonación. El sitio *Sma* I se encuentra localizado entre los sitios *Bgl* II y *Sal* I, por lo que la ligación del inserto VP4 producirá la pérdida de dicho sitio *Sma* I. De tal forma, la restricción del DNA de colonias que sólo contengan al vector vacío produciría una linearización del mismo (1 sola banda de 5.3 Kb), mientras que en colonias recombinantes sería imposible linearizar el plásmido. El corrimiento electroforético de la restricción con la enzima *Sma* I, mostró que el fragmento de 5.3 Kb se presentó sólo en una de las colonias (1), lo cual indica que esta colonia no es recombinante. Sin embargo en las demás colonias (2 y 3) no se observó dicha banda, lo que sugiere que estas sí pueden ser bacterias recombinantes. Para corroborar la presencia de la secuencia génica VP4 en el

plásmido, en las colonias 2 y 3, se realizó un análisis por PCR, usando los oligonucleótidos VP4F Y VP4R.

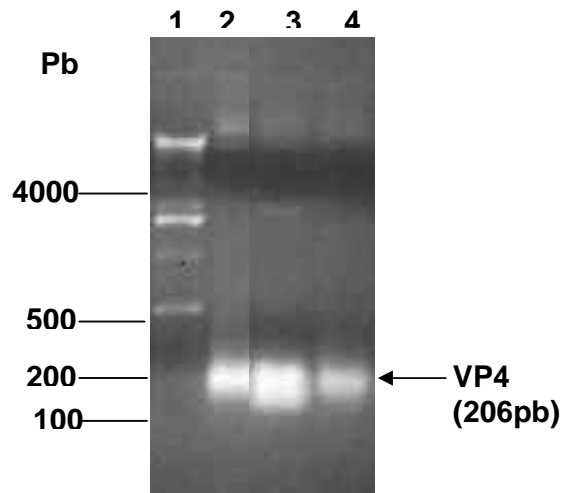


Figura 8. Escrutinio del gen VP4 mediante PCR. Ensayo de PCR en muestras de ADN de bacterias transformadas con pDISVP4. El ADN de 2 colonias transfectadas con pDISVP4 seleccionadas fue amplificado usando los oligos VP4 F y VP4 R. El producto de la reacción fue examinado en un gel de agarosa al 1%. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular; 2.- control positivo; 3.- ADN de la colonia 1, 4.- ADN de la colonia 2.

En la Figura 8 se aprecia que se amplificó un producto en las colonias seleccionadas del mismo peso al que se observa en el control positivo, y que corresponde al peso esperado para VP4 (204pb). Estos resultados muestran que el gen VP4 fue clonado acertadamente en el vector pDISPLAY.

Con la finalidad de verificar la integridad de los genes VP1, VP2 y VP4 clonados en el vector pDISPLAY, se procedió a secuenciarlos utilizando los oligonucleótidos ya mencionados en la metodología. El uso de estos oligonucleótidos permitió secuenciar los genes completos.

Para todos los casos se generó una secuencia prototipo de los genes VP1 o VP2 o VP4 con ayuda del programa DNAClub, con la cual se compararon las secuencias de los genes clonados.

A continuación se presenta la alineación de la secuencia prototipo (VP1) y las obtenidas con los diferentes oligonucleótidos:

```

vp1      TAGGTCAGATGCTTGAAGCATGATTGACAACACAGTCCGTGAAACGGTGGGGGCGGCAA
vp1F     -----AGCTTGAT-GCATGATTGACA-CACAGTCCGTGAAACGGTGGGGGCGGCAA
vp1R     -----
                *****

```

OLIGO VP1F CGAATTCATGGGGTTAGGTCAG

BamH I

Nota: el inicio de todos los oligos no fue secuenciado, pues no aparecen completos en las secuencias.

```

vp1      CATCTAGAGACGCTCTCCCAAACACTGAAGCCAGTGGACCAACACACTCCAAGGAAATTC
vp1F     CATCTAGAGACGCTCTCCCAAACACTGAAGCCAGTGGACCAACACACTCCAAGGAAATTC
vp1R     -----
                *****

```

```

vp1      CGGCACTCACCGCAGTGGAAACTGGGGCCACAAATCCACTAGTCCCTTCTGATACAGTGC
vp1F     CGGCACTCACCGCAGTGGAAACTGGGGCCACAAATCCACTAGTCCCTTCTGATACAGTGC
vp1R     -----
                *****

```

```

vp1      AAACCAGACATGTTGTACAACATAGGTCAAGGTCAGAGTCTAGCATAGAGTCTTTCTTCG
vp1F     AAACCAGACATGTTGTACAACATAGGTCAAGGTCAGAGTCTAGCATAGAGTCTTTCTTCG
vp1R     -----
                *****

```

```

vp1      CGCGGGGTGCATGCGTGACCATTATGACCGTGGATAACCCAGCTTCCACCACGAATAAGG
vp1F     CGCGGGGTGCATGCGTGACCATTATGACCGTGGATAACCCAGCTTCCACCACGAATAAGG
vp1R     -----
                *****

```

```

vp1      ATAAGCTATTTGCAGTGTGGAAGATCACTTATAAAGATACTGTCCAGTTACGGAGGAAAT
vp1F     ATAAGCTATTTGCAGTGTGGAAGATCACTTATAAAGATACTGTCCAGTTACGGAGGAAAT
vp1R     -----GGAAT
                *****

```

```

vp1      TGGAGTTCTTCACCTATTCTAGATTTGATATGGAACTTACCTTTGTGGTTACTGCAAATT
vp1F     TGGAGTTCTTCACCTATTCTAGATTTGATATGGAACTTACCTTTGTGGTTACTGCAAATT
vp1R     TGGAGTTCTTCACCTATTCTAGATTTGATATGGAACTTACCTTTGTGGTTACTGCAAATT
                *****

```

vp1 TCACTGAGACTAACAAATGGGCATGCCTTAAATCAAGTGTACCAAATTATGTACGTACCAC  
 vp1F TCACTGAGACTAACAAATGGGCATGCCTTAAATCAAGTGTACCAAATTATGTACGTACCAC  
 vp1R TCACTGAGACTAACAAATGGGCATGCCTTAAATCAAGTGTACCAAATTATGTACGTACCAC  
 \*\*\*\*\*

vp1 CAGGCGCTCCAGTGCCCGAGAAATGGGACGACTACACATGGCAAACCTCATCAAATCCAT  
 vp1F CAGGCGCTCCAGTGCCCGAGAAATGGGACGACTACACATGGCAAACCTCATCAAATCCAT  
 vp1R CAGGCGCTCCAGTGCCCGAGAAATGGGACGACTACACATGGCAAACCTCATCAAATCCAT  
 \*\*\*\*\*

vp1 CAATCTTTTACACCTACGGAACAGCTCCAGCCGGATCTCGGTACCGTATGTTGGTATTT  
 vp1F CAATCTTTTACACCTACGGAACAGCTCCAGCCGGATCTCGGTACCGTATGTTGGTATTT  
 vp1R CAATCTTTTACACCTACGGAACAGCTCCAGCCGGATCTCGGTACCGTATGTTGGTATTT  
 \*\*\*\*\*

vp1 CGAACGCCTATTACACTTTTACGACGGTTTTTCCAAAGTACCACTGAAGGACCAGTCGG  
 vp1F CGAACGCCTATTACACTTTTACGACGGTTTTTCCAAAGTACCACTGAAGGACCAGTCGG  
 vp1R CGAACGCCTATTACACTTTTACGACGGTTTTTCCAAAGTACCACTGAAGGACCAGTCGG  
 \*\*\*\*\*

vp1 CAGCACTAGGTGACTCCCTTTATGGTGCAGCATCTCTAAATGACTTCGGTATTTTGGCTG  
 vp1F CAGCACTAGGTGACTCCCTTTATGGTGCAGCATCTCTAAATGACTTCGGTATTTTGGCTG  
 vp1R CAGCACTAGGTGACTCCCTTTATGGTGCAGCATCTCTAAATGACTTCGGTATTTTGGCTG  
 \*\*\*\*\*

vp1 TTAGAGTAGTCAATGATCACAACCCGACCAAGGTCACCTCCAAAATCAGAGTGTATCTAA  
 vp1F TTAGAGTAGTCAATGATCACAACCCGACCAAGGTCACCTCCAAAATCAGAGTGTATCTAA  
 vp1R TTAGAGTAGTCAATGATCACAACCCGACCAAGGTCACCTCCAAAATCAGAGTGTATCTAA  
 \*\*\*\*\*

vp1F AACCCAAACACATCAGAGTCTGGTGCCCGCTCCACCGAGGGCAGTGGCGTACTACGGCC  
 vp1R AACCCAAACACATCAGAGTCTGGTGCCCGCTCCACCGAGGGCAGTGGCGTACTACGGCC  
 \*\*\*\*\*

vp1 CTGGAGTGGATTACAAGGATGGTACGCTTACACCCCTCTCCACCAAGGATCTGACCACA  
 vp1F CTGGAGTGGATTACAAGGATGGTACGCTTACAC-----  
 vp1R CTGGAGTGGATTACAAGGATGGTACGCTTACACCCCTCTCCACCAAGGATCTGACCACA  
 \*\*\*\*\*

```

vp1      TAT
vp1F    ---
vp1R    TAT
        ***

oligo vp1R CCTCGAG GTGTCCGAATCCATA
           Xho I CACAGGCTTAGGTAT

```

**Nota: gran parte de este oligo no se secuenció, sin embargo la secuenciación de gen VP1 si esta completa.**

Figura 9. Comparación de secuencias de VP1. Alineación entre la secuencia de gen prototipo VP1 con las secuencias obtenidas del análisis del ADN de colonias transformadas con el plásmido pDISVP1, utilizando los oligonucleótidos VP1F/BamH I y VP1R/Xho I.

Al comparar la secuencia analizada con la secuencia prototipo del gen VP1 (figura 9) se observó lo siguiente:

La reacción con el oligonucleótido VP1F/BamH I permitió secuenciar a partir de 13pb de la región de policlonación río arriba del inserto y el oligonucleótido VP1R/Xho I permitió terminar de secuenciar al gen que codifica para la proteína VP1, mostrando una concordancia del 100% con la secuencia conocida del gen.

A continuación se presenta la alineación de las secuencias obtenidas del gen VP2 utilizando los oligonucleótidos VP2 F/BamH I Y VP2 R/Xho I.

```

vp2      ATGCTAAACTCGCCAAACATAGAGGCTTGCGGGTATAGCGATAGAGTACT
vp2f    -----TCGCCAAACATAGAGGCTTGCGGGTATAGCGATAGAGTACT
vp2R    ATGCTAAACTCGCCAAACATAGAGGCTTGCGGGTATAGCGATAGAGTACT
        *****

OLIGO VP2f CGAATTCGCCCAATGCTAAAC

```

```

vp2      GCAATTAACACTGGGAAACTCCACTATAACCACACAGGAGGCGGCTAATTCAGTAGTCGC
vp2f    GCAATTAACACTGGGAAACTCCACTATAACCACACAGGAGGCGGCTAATTCAGTAGTCGC
vp2R    GCAATTAACACTGGGAAACTCCACTATAACCACACAGGAGGCGGCTAATTCAGTAGTCGC
        *****

```

```

vp2      TTATGGGCGTTGGCCTGAATATCTGAGGGACAGCGAAGCCAATCCAGTGGACCAGCCGAC
vp2f    TTATGGGCGTTGGCCTGAATATCTGAGGGACAGCGAAGCCAATCCAGTGGACCAGCCGAC
vp2R    TTATGGGCGTTGGCCTGAATATCTGAGGGACAGCGAAGCCAATCCAGTGGACCAGCCGAC
        *****

```

vp2 AGAACCAGACGTCGCTGCATGCAGGTTTTATACGCTAGACACCGTGTCTTGGACGAAAGA  
vp2f AGAACCAGACGTCGCTGCATGCAGGTTTTATACGCTAGACACCGTGTCTTGGACGAAAGA  
vp2R AGAACCAGACGTCGCTGCATGCAGGTTTTATACGCTAGACACCGTGTCTTGGACGAAAGA  
\*\*\*\*\*

vp2 GTCGCGAGGGTGGTGGTGAAGTTGCCTGATGCACTGAGGGACATGGGACTCTTTGGGCA  
vp2f GTCGCGAGGGTGGTGGTGAAGTTGCCTGATGCACTGAGGGACATGGGACTCTTTGGGCA  
vp2R GTCGCGAGGGTGGTGGTGAAGTTGCCTGATGCACTGAGGGACATGGGACTCTTTGGGCA  
\*\*\*\*\*

vp2 AAATATGTACTACCACTACCTAGGTAGGTCCGGGTACACCGTGCATGTACAGTGTAAACGC  
vp2f AAATATGTACTACCACTACCTAGGTAGGTCCGGGTACACCGTGCATGTACAGTGTAAACGC  
vp2R AAATATGTACTACCACTACCTAGGTAGGTCCGGGTACACCGTGCATGTACAGTGTAAACGC  
\*\*\*\*\*

vp2 CTCCAAATTCACCAGGGGGCACTAGGGGTATTGCGCCGTACCAGAGATGTGTCTGGCCGG  
vp2f CTCCAAATTCACCAGGGGGCACTAGGGGTATTGCGCCGTACCAGAGATGTGTCTGGCCGG  
vp2R CTCCAAATTCACCAGGGGGCACTAGGGGTATTGCGCCGTACCAGAGATGTGTCTGGCCGG  
\*\*\*\*\*

vp2 GGATAGCAACACCACTACCATGCACACCAGCTATCAAAATGCCAATCCTGGCGAGAAAGG  
vp2f GGATAGCAACACCACTACCATGCACACCAGCTATCAAAATGCCAATCCTGGCGAGAAAGG  
vp2R GGATAGCAACACCACTACCATGCACACCAGCTATCAAAATGCCAATCCTGGCGAGAAAGG  
\*\*\*\*\*

vp2 AGGCACTTTCACGGGTACGTTCACTCCTGACAACAACCAGACATCACCTGCCCGCAGGTT  
vp2f AGGCACTTTCACGGGTACGTTCACTCCTGACAACAACCAGACATCACCTGCCCGCAGGTT  
vp2R AGGCACTTTCACGGGTACGTTCACTCCTGACAACAACCAGACATCACCTGCCCGCAGGTT  
\*\*\*\*\*

vp2 CTGCCCCGGTGGATTACCTCCTTGAAATGGCACGTTGTTGGGGAATGCCTTTGTGTTCC  
vp2f CTGCCCCGGTGGATTACCTCCTTGAAATGGCACGTTGTTGGGGAATGCCTTTGTGTTCC  
vp2R CTGCCCCGGTGGATTACCTCCTTGAAATGGCACGTTGTTGGGGAATGCCTTTGTGTTCC  
\*\*\*\*\*

vp2 CGCACCAGATAATAAACCTACGGACCAACAACCTGTGCTACACTGGTACTCCCTTACGTGA  
vp2f CGCACCAGATAATAAACCTACGGACCAACAACCTGTGCTACACTGGTACTCCCTTACGTGA  
vp2R CGCACCAGATAATAAACCTACGGACCAACAACCTGTGCTACACTGGTACTCCCTTACGTGA  
\*\*\*\*\*

```

vp2      ACTCCCTCTCGATAGATAGTATGGTAAAGCACAAATAATTGGGGAATTGCAATATTACCAT
vp2f     ACTCCCTCTCGATAGATAGTATGGTAAAGCACAAATAATTGGGGAATTGCAATATTACCAT
vp2R     ACTCCCTCTCGATAGATAGTATGGTAAAGCACAAATAATTGGGGAATTGCAATATTACCAT
          *****

vp2      TGGCCCCATTAAATTTTGCTAGTGAGTCCTCCCCAGAGATTCCAATCACCTTGACCATAG
vp2f     TGGCCCCATTAAATTTTGCTAGTGAGTCCTCCCCAGAGATTCCAATCACCTTGACCATAG
vp2R     TGGCCCCATTAAATTTTGCTAGTGAGTCCTCCCCAGAGATTCCAATCACCTTGACCATAG
          *****

vp2      CCCCTATGTGCTGTGAGTTCAATGGATTAAGAAACATCACCCTGCCACGCTTACAGG
vp2f     CCCCTATGTGCTGTGAGTTCAATGGATTAAGAAACATCACCCTGCCACGCTTACAGG
vp2R     CCCCTATGTGCTGTGAGTTCAATGGATTAAGAAACATCACCCTGC-----
          *****

Oligo vp2R CCTCGAG GCCCTGTAAGCGTGG
           Xho I  CGGGACATTCGCACC

```

Fig. 10. Alineación de secuencias de VP2. Comparación de la secuencia del gen (VP2) con las secuencias obtenidas del análisis del ADN de colonias transformadas con el plásmido pDISVP2, utilizando los oligonucleótidos VP2F/BamH I y VP2R/Xho I.

Al cotejar la secuencia obtenida, con los oligonucleótidos respectivos, con la secuencia prototipo del gen de VP2 (figura 10) se observó que se pudo secuenciar del sitio 950 al 1765 del genoma viral, lo cual corresponde al 100% del gen VP2, mostrando una similitud del 100% con la secuencia conocida del gen, lo cual indica que no hubo ningún cambio en la secuencia que afectara la estructura de la proteína.

En seguida se muestra la alineación de la secuencia prototipo del gen VP4 obtenida, con los oligonucleótidos VP4 F/BamH I Y VP4 R/Xho I.

```

vp4R     ATGGGTGCTCAGGTTTCATCACAGAAAGTGGGCGCACATGAAAAC TCAAATAGAGCGTAT
vp4F     -----AATCATCACAGAATGTGGGCGCACATGAAAAC TCAAATAGAGCGTAT
vp4R     ATGGGTGCTCAGGTTTCATCACAGAAAGTGGGCGCACATGAAAAC TCAAATAGAGCGTAT
          *****

OLIGO VP4F CGAATTC ATGGGTGCTCAGGTT
           BamH I

```



```

vp4      GGTGGTTCCTACCATTAATTACACCACCATTAATTATTATAGAGATTCAGCTAGTAACGCG
vp4F     GGTGGTTCCTACCATTAATTACACCACCATTAATTATTATAGAGATTCAGCTAGTAACGCG
Vp4R    GGTGGTTCCTACCATTAATTACACCACCATTAATTATTATAGAGATTCAGCTAGTAACGCG
          *****

vp4      GCTTCGAAACAGGACTTCTCTCAAGACCCTTCCAAGTTCACCGAGCCCATCAAGGATGTC
vp4F     GCTTCGAAACAGGACTTCTCTCAAGACCCTTCCAAGTTCACCGAGCCCATCAAGGATGTC
Vp4R    GCTTCGAAACAGGACTTCTCTCAAGACCCTTCCAAGTTCACCGAGCCCATCAAGGATGTC
          *****

vp4      CTGATAAAAACAGCCCAATGCTAAACT
vp4F     CTGATAAAAACAGCCCAATGCTAAACT
Vp4R    -TGNTAGCATTGGAGACGATGTGGT---
          *****

Oligo vp4R  CTCGAG  GTTTAGCATTGGGGC
              Xho I  CAAATCGTAACCCCG

```

Fig. 11. Cotejo de secuencias de VP4. Alineación entre la secuencia prototipo (VP4) con las secuencias obtenidas, del análisis de ADN de colonias transformadas con el plásmido pDISVP4, utilizando los oligonucleótidos VP4F y VP4R.

Al equiparar la secuencia analizada con la secuencia prototipo del gen VP4 (figura 11) se apreció lo siguiente:

La alineación de la secuencia prototipo del gen VP4 con las secuencias obtenidas del análisis del plásmido pDISVP4, permitió secuenciar del sitio 743 al 949 del genoma viral, lo cual corresponde al 100% del gen VP4, mostrando una concordancia del 100% con la secuencia conocida del gen. Esto demuestra que no hubo ningún cambio en la secuencia de este gen.

### Inducción de tumores.

En el presente trabajo se utilizó como modelo tumoral el melanoma en ratones de la cepa C57Bl/6 y fue inducido por el trasplante intradérmico de la línea celular singénica B16FO. El desarrollo de los tumores fue monitoreado cada 2 días.

En la figura 12 se observa que el crecimiento del tumor fue proporcional al tiempo. A los 10 días los tumores tenían un promedio de 1.0 mm<sup>2</sup> de área, el máximo observado fue de 6.5 mm<sup>2</sup> a los 40 días.

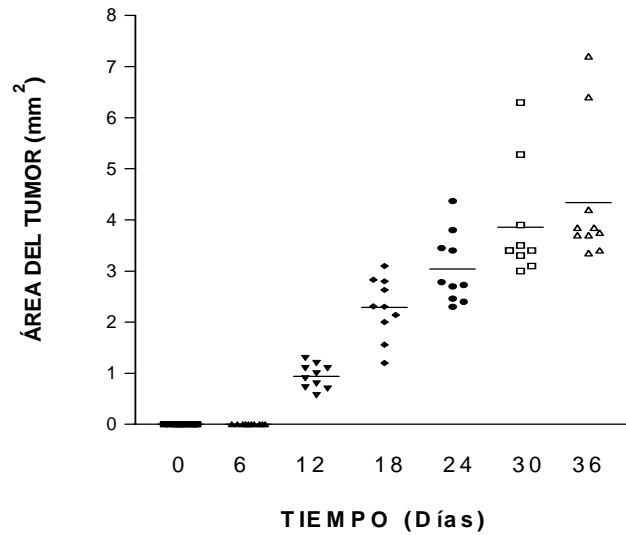


Figura 12. Desarrollo de tumores de melanoma en ratones.  $5 \times 10^5$  células B16FO fueron administradas intradérmicamente en el costado derecho de ratones C57Bl/6. El crecimiento tumoral fue registrado a los tiempos indicados. Cada grupo de puntos representa 10 ratones.

Como se esperaba el crecimiento del tumor es proporcional al tiempo. A los 10 días los tumores tenían un promedio de  $1.0 \text{ mm}^2$  de área, el máximo observado fue de  $6.5 \text{ mm}^2$  a los 34 días. De manera general se observó que un promedio de 48% de ratones que fueron inoculados con células tumorales desarrolló tumores.

En la figura 13 se muestran 3 diferentes ratones con distintos tamaños de tumores de melanoma. Las imágenes de cada ratón fueron tomadas en el día 40 del crecimiento tumoral.

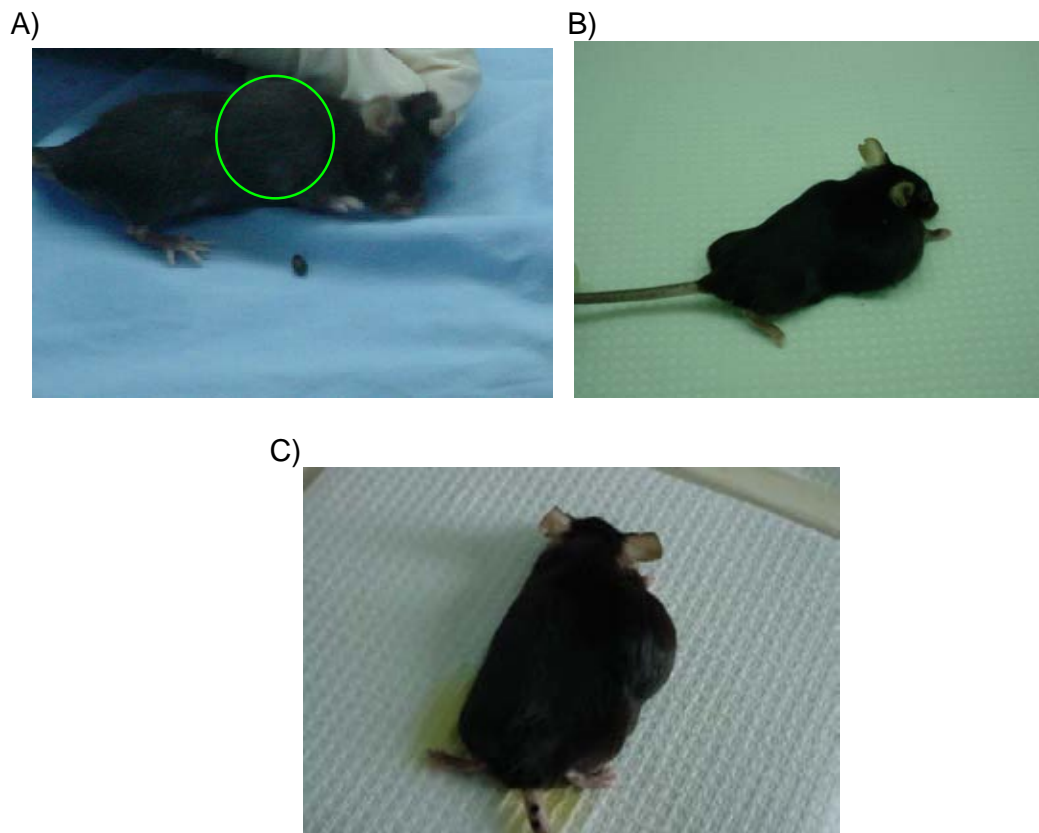


Figura 13. Imágenes de ratones con tumores de melanoma. A) Imagen de un ratón con un tumor de  $5.2\text{mm}^2$  de área. B) Imagen de un ratón con tumor de  $6.3\text{mm}^2$  de área. C) Imagen de un ratón con tumor de  $7.2\text{mm}^2$  de área. Las fotos fueron tomadas en el día 40 del desarrollo tumoral.

Los ratones que desarrollaron tumores presentaron una supervivencia heterogénea. De tal forma, a los 10 días se observó una supervivencia del 100% y el tamaño del tumor presentó un promedio de  $1.0\text{mm}^2$  de área, mientras que a los 20 días hubo una supervivencia del 50% y la masa tumoral presentó un promedio de  $3.8\text{mm}^2$  de área aproximadamente. A los 30 días se observó una supervivencia de 25% aproximadamente y el tamaño del tumor tenía un promedio de  $5.8\text{mm}^2$  de área. Finalmente a los 40 días hubo una supervivencia del 0% observándose un promedio de  $6.5\text{mm}^2$  de área del tumor (ver Figura 14). De los ratones que presentaron tumores el 1% desarrollo metástasis al día 37 de desarrollo tumoral.

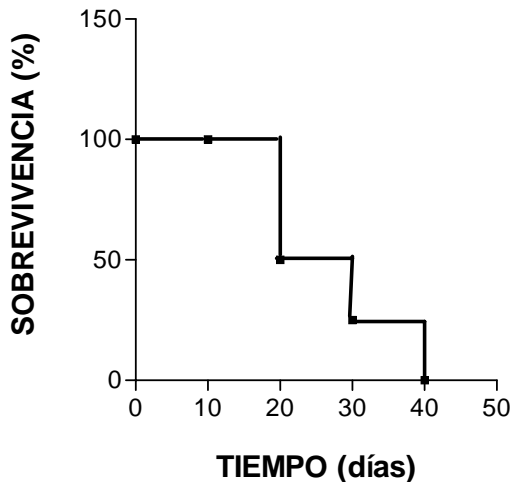


Figura 14. Supervivencia de ratones con tumores. Los tumores fueron inducidos por la inoculación de  $5 \times 10^4$  células B16F0 en ratones C57Bl/6. El promedio de animales vivos fue registrado cada dos días después del inicio del desarrollo de tumores. Cada punto representa la media de 10 ratones. De los ratones que presentaron tumores el 1% desarrolló metástasis al día 37 de desarrollo tumoral.

De lo anterior podemos concluir que la inyección de  $5 \times 10^4$  células B16FO es suficiente para generar tumores en ratones C57Bl/6. Por otro lado, el crecimiento tumoral se desarrolló de la siguiente manera: A los 10 días de crecimiento tumoral se observaron masas tumorales de  $1.0 \text{ mm}^2$  de área en promedio y hubo una supervivencia del 100%. El crecimiento fue proporcional al tiempo. Después de los 40 días ningún animal sobrevive y mostraron masas tumorales mayores a  $6.5 \text{ mm}^2$  de área, por lo que el tiempo ideal para el tratamiento de las masas tumorales con los plásmidos construidos será en el 10 día o cuando el tumor tiene un promedio de  $1.0 \text{ mm}^2$  de área.

### **Tratamiento de tumores con los plásmidos pDISVP1, pDISVP2 o pDISVP4.**

Con el fin de conocer el efecto del tratamiento sobre el crecimiento tumoral, cuando los tumores de los ratones, inmunizados y no inmunizados, alcanzaron un área de  $0.8 - 1.2 \text{ mm}^2$  fueron sometidos al tratamiento con los plásmidos.

En la figura 15 se aprecia que ninguno de los tratamientos con los plásmidos afectó el desarrollo tumoral, presentando un crecimiento semejante al observado en los tumores no tratados.

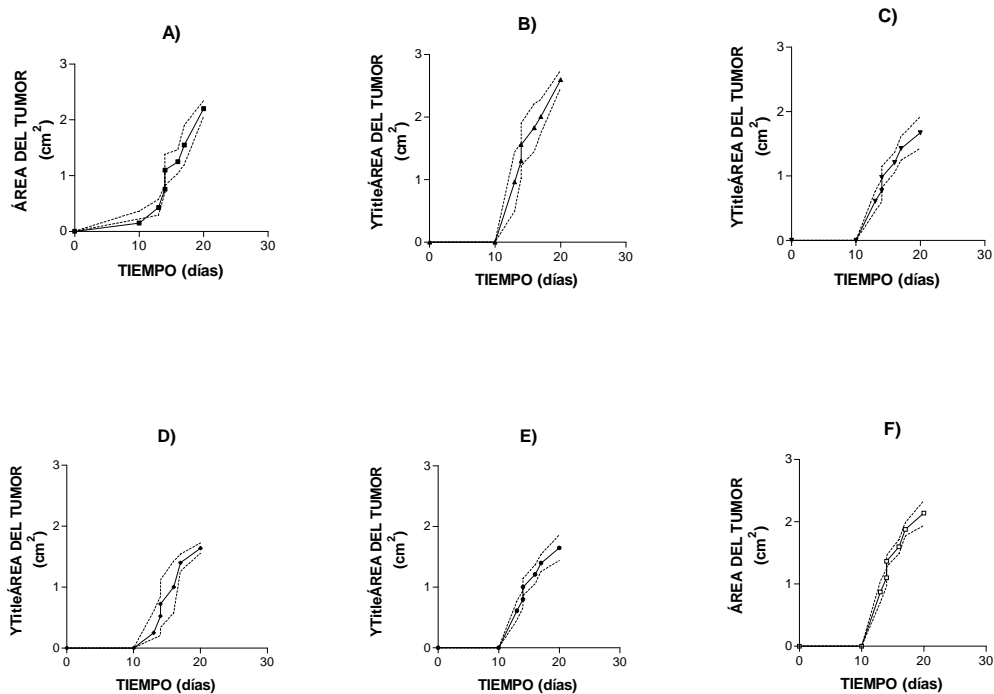


Figura 15. Tratamiento de tumores de ratones con los plásmidos. A) Ratones inmunizados y tratados con pDISVP1+pDISVP4. B) Ratones inmunizados y tratados con pDISVP1+pDISVP2+ pDISVP4. C) Ratones inmunizados y no tratados. D) Ratones no inmunizados y tratados con pDISVP1 +pDISVP4. E) Ratones no inmunizados y tratados con pDISVP1+pDISVP2+ pDISVP4. F) Ratones no inmunizados y no tratados. El crecimiento tumoral fue registrado a los tiempos indicados. Cada punto representa la media de 10 ratones.

Los resultados obtenidos indican que la administración directa de los plásmidos en las masas tumorales no produce algún efecto detectable en su crecimiento. Esto podría deberse a varios factores, entre ellos una baja eficiencia de transfección, un nivel bajo en la expresión de los antígenos, o bien a que los ratones vacunados no hubieran desarrollado una respuesta inmune que les permitiera reaccionar contra las células transfectadas. Para explorar estas posibilidades se realizaron los experimentos que a continuación se detallan.

Con la finalidad de determinar la eficiencia de la transfección *in vivo*, se inocularon los plásmidos directamente en masas tumorales de ratones. Un total de 64 tumores fueron inoculados con los plásmidos pDISVP1 y pDISVP4 o con pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4. La presencia de los diferentes plásmidos fue estudiada por PCR, Los resultados del análisis se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Análisis comparativo del tratamiento de tumores.

SECUENCIA GÉNICA	PLÁSMIDOS ADMINISTRADOS		EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN (%)
	pDISVP1+pDISVP4 <sup>x</sup> (No. Tumores positivos)	pDISVP1+pDISVP2+pDISVP4 <sup>c</sup> (No. Tumores positivos)	
VP1	2	1	4.6
VP2	0	0	0.0
VP4	1	1	3.1

<sup>x</sup> Un total de 34 tumores fueron tratados con pDISVP1+pDISVP4. <sup>c</sup> un total de 30 tumores fueron tratados con pDISVP1+pDISVP2+pDISVP4.

La secuencia que codifica VP1 fue amplificada en 3 muestras, lo cual corresponde a una eficiencia de transfección de 4.6%. Por otro lado, la secuencia VP2 no pudo ser amplificada en ninguna de las muestras. Finalmente la secuencia VP4 fue amplificada en 2 muestras, por lo que tuvo una eficiencia de transfección de 3.1%.

Los resultados anteriores parecen indicar que la administración directa de los plásmidos en los tumores tiene un nivel de transfección muy bajo, lo cual impactaría negativamente en la expresión de los antígenos. Por lo tanto con la finalidad de determinar el nivel de expresión de los antígenos *in vivo*, se obtuvieron biopsias de las masas tumorales transfectadas con los plásmidos y se procesaron para la obtención de proteínas totales. La presencia de las proteínas VP1, VP2 Y VP4 fue estudiada por Western blot (ver figura 16).

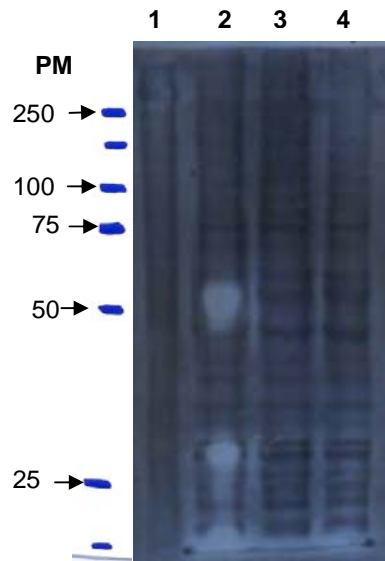


FIGURA 16. Western blot de proteínas totales de tumores tratados con los plásmidos pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4. Las proteínas fueron detectadas con el anticuerpo monoclonal anti-virus de la polio (Chemicon). Carriles: 1.- Marcador de Peso Molecular; 2.- proteínas totales de tumor no tratado; 3.- proteínas totales de tumor tratado con pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4; 4.- proteínas totales de tumor tratado con pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4.

En la figura 16 se observa el mismo patrón de bandeo en los extractos proteicos de los diferentes tratamientos y ninguna corresponde a las bandas esperadas de las proteínas virales. Este resultado indica que no fue posible detectar las proteínas virales en las células tumorales transfectadas *in vivo*.

Nuestro resultados parecen indicar una transfección deficiente, y por lo tanto la falta de expresión de los antígenos virales, pueden ser la causa de la ausencia de respuesta al tratamiento con los plásmidos. Sin embargo, para descartar que dicho fenómeno se deba a que la inmunización inicial no haya inducido una respuesta inmune primaria, se estudió la presencia de anticuerpos anti-polio y su capacidad neutralizante en el suero de ratones inmunizados con la vacuna oral Sabin.

Para determinar la presencia de anticuerpos sistémicos, los sueros de los ratones fueron analizados en un ensayo de detección específica de partículas virales en células HeLa infectadas con virus de la polio (tipos 1, 2 y 3). Dicho ensayo es una inmunocitoquímica en la que los diferentes sueros a analizar son usados como anticuerpo primario. Su reactividad es comparada con la de un anticuerpo monoclonal

comercial como control positivo, y con sueros de ratones no inmunizados como control negativo.

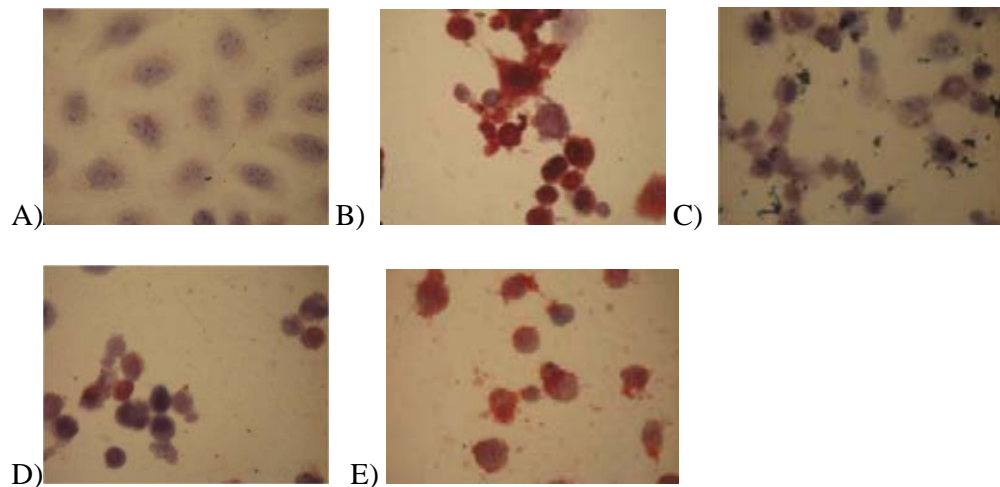


Figura 17. Análisis de la presencia de anticuerpos por inmunocitoquímica (100x). A) control negativo, células HeLa no infectadas. B) Control positivo, células infectadas en presencia del anticuerpo comercial anti-polio C) células infectadas incubadas con sueros de ratones no vacunados D) células infectadas incubadas con sueros de ratones vacunados con 2 dosis de la vacuna anti-polio E) células infectadas en presencia de sueros de ratones vacunados con 3 dosis de la vacuna anti-polio.

Como se observa en la Figura 17, los anticuerpos presentes en los sueros de ratones inmunizados no reaccionan con células HeLa control no infectadas (A), mientras que claramente reaccionan con células infectadas mostrando una tinción citoplasmática de las células, el cual es similar al observado cuando se utilizó el anticuerpo comercial (B), mientras que los sueros de ratones no vacunados no reaccionan con las células infectadas (C). A pesar de que los sueros de ratones vacunados reaccionan a células infectadas, la tinción observada al utilizar suero de ratones inmunizados con 2 dosis de la vacuna anti-polio es muy escasa comparada con la observada al utilizar el suero de ratones inmunizados con 3 dosis, lo cual indica que la vacunación en ratones contra la polio induce una respuesta inmune mediada por anticuerpos contra el virus.

Para poder determinar la capacidad neutralizante de los anticuerpos de ratones inmunizados, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la infección. Para ello se incubaron los sueros de los ratones inmunizados y no inmunizados con virus de la polio y posteriormente se utilizaron células HeLa para infectar.



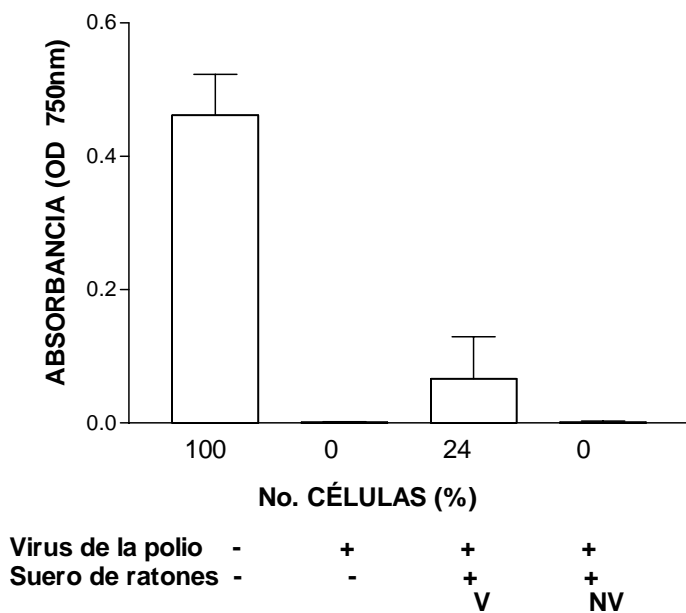


Figura 18. Ensayo de Inhibición de la infección por virus de la polio en células HeLa. 50µl de virus en cultivo fueron incubados por 24h con sueros de ratones inmunizados y no inmunizados. Estos virus fueron usados para infectar monocapas de células HeLa. El número de células vivas se registró 24h después. V representa sueros de ratones inmunizados. NV representa suero de ratones no inmunizados.

Como se observa en la figura 18, los anticuerpos del suero del ratón inmunizado son capaces de neutralizar parcialmente al virus de la polio al inhibir la infección de las células HeLa ya que evitó la muerte de 24% de las células, en comparación con el suero del ratón no inmunizado donde no se observa inhibición alguna (mueren todas las células), corroborando que los ratones no inmunizados no presentan anticuerpos contra el poliovirus. Todo esto indica que la inmunización con la vacuna Sabin induce una respuesta inmune, por lo que la falta de respuesta al tratamiento con los plásmidos se debe probablemente a la ausencia de expresión de los antígenos en las células tumorales.

## **DISCUSIÓN**

En el presente proyecto se propuso estudiar la posibilidad de dirigir una respuesta de memoria en contra de células tumorales a través de su transfección con plásmidos que expresan las proteínas de la cápside del virus de la poliomielitis humana. Sin embargo esto no pudo ser posible dado que no hubo una transfección exitosa que pudiera inducir una respuesta inmune.

Con esta finalidad se clonaron los genes que codifican para las proteínas VP1, VP2, y VP4 en el vector pDISPLAY, el cual posee señales para el transporte a la membrana y anclaje en la misma de la proteína de interés. Una vez inducidos los tumores en los ratones se realizó el tratamiento de los mismos con los plásmidos contruidos (pDISVP1 y pDISVP2 y pDISVP4), los resultados de la medición de la masa tumoral indicaron que ningún tratamiento tuvo efecto en el crecimiento tumoral. El cambio de vector se debe a que pDISPLAY es un vector diseñado específicamente para ser usado en la inyección directa de ADN, ya que presenta expresión constitutiva de alto nivel en mamíferos. Existen reportes que demuestran la utilidad de este como vector de expresión en diversos tipos de vacuna génicas (Forns, 1999; Tobiasch, 2001; Chen, 2002; Puttikhunt, 2003; Yang 2007). Estos resultados podrían deberse a varios factores, entre ellos una baja eficiencia de transfección, un nivel bajo en la expresión de los antígenos, o bien a que los ratones inmunizados contra la polio no hubieran desarrollado una respuesta inmune que les permitiera reaccionar contra las células transfectadas. Con respecto al nivel de transfección del gen VP1, fue de 4.6%, el del gen VP2 fue de 0% y del gen VP4 fue de 3.1%, lo que indica que el nivel de transfección es bajo. Este fenómeno tendría una incidencia directa sobre la disponibilidad de antígenos, la cual sería sumamente baja y afectaría el desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral.

Dado que la eficiencia de transfección fue baja, se esperaría un nivel igualmente bajo de expresión de los antígenos virales en las células tumorales. Sin embargo, el análisis por Western blot de extractos de proteína total de las células tumorales no nos permitió detectar la presencia clara de proteínas virales. La incapacidad de detectar la expresión de las proteínas se podría deber a las siguientes posibilidades: a la ausencia de expresión de las proteínas virales, a la incapacidad de los métodos utilizados para detectar las proteínas virales, a la rápida degradación de las proteínas virales o al secuestro de las proteínas virales en gránulos densos.

La degradación rápida de las proteínas virales es probable ya que las proteínas de la cápside del virus de la polio son sumamente inestables cuando no se ensamblan entre si para formar cápsides. En nuestro modelo sólo se incluyeron plásmidos para la expresión de tres proteínas de la cápside. Por lo tanto, la no detección de las proteínas virales se debe a la ineficiente transfección más que a la degradación de las proteínas. Pero existe la posibilidad de que las pocas proteínas sean expresadas, pero que se doblen de manera inadecuada y sean secuestradas en gránulos densos para su posterior degradación. Lo anterior es un evento probable ya que las proteínas de la cápside también son inestables debido a la falta de modificaciones post-traduccionales (Ansardi, 1992; Howley, 2001). Esta posible explicación concuerda con trabajos donde las proteínas virales de virus polio no están libres en el citoplasma y son degradadas (Bruneau, 1983). Sin embargo, también existen trabajos donde utilizan las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 para inmunizar ratones y no mencionan degradación alguna (Kutubuddin, 1992<sub>a</sub>; Kutubuddin, 1992<sub>b</sub>).

En este trabajo se demostró que la inmunización de ratones recién destetados con la vacuna oral anti-poliomielítica induce anticuerpos contra el virus de la polio y que estos son capaces de neutralizar al virus. Estos datos coinciden con diversos estudios que han demostrado que la vacunación en humanos con la vacuna oral Sabin induce anticuerpos (Minor, 1996; Evans, 1991). Existen pocos estudios sobre la inmunización en ratones con poliovirus (Katrak, 1991), pero hay varios estudios que utilizan ratones transgénicos, los cuales expresan el receptor de poliovirus humano y presentan una respuesta inmune (Koike, 1991; Horie, 1994). La presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de los ratones vacunados sugiere que en estos se desarrolló una respuesta inmune mediada por la vacuna. Sin embargo la existencia de una respuesta humoral no garantiza que también se haya desarrollado una respuesta de tipo celular, la cual sería indispensable para la eliminación de células tumorales. Para investigar más a fondo lo anterior será necesario estudiar la respuesta celular en los ratones vacunados, definiendo el tipo de población linfocítica activada, el perfil de citocinas secretado por los linfocitos cooperadores y el potencial reactivo de los linfocitos citotóxicos.

La respuesta contra poliovirus en los ratones es muy baja, dado la poca detección de anticuerpos, probablemente esto se deba a que este animal no es susceptible a la infección con este virus (Horie, 1994; Destombes, 1997; Mahon, 1995), lo que contribuya a la poca respuesta. La infección sólo se induce en ratones

transgénicos para el receptor del poliovirus (Ren, 1992; Koike, 1991; Horie, 1994). Hay pocos estudios que demuestran que la sola vacunación con poliovirus induce una respuesta pero gracias al uso del adyuvante aluminio (Katrak, 1991) y no está dada por el corto tiempo en que se realizó la colecta de los sueros en este trabajo (10 días después de cada inmunización). Ya que estudios en humanos, que son el huésped natural del poliovirus, la presencia de anticuerpos se obtiene en pocos días después de la inmunización con la vacuna oral. Por ejemplo, la respuesta inmune inducida es muy alta como se ve en los trabajos siguientes: en un estudio, donde analizan la respuesta en neonatos e infantes hacia la vacuna oral contra poliomiélitis, observan que la inmunización (aplicando 3 dosis con intervalos de 4 semanas) en neonatos de 1- 6 semanas hasta 24 meses de edad, obteniendo los sueros 4 y 12 semanas después de la última inmunización, inducen niveles de anticuerpos altos que oscilan entre 53 y 83 % para los tres tipos de virus (John, 1984). En otro estudio, analizaron la inmunogenicidad de la vacuna oral contra poliovirus en infantes de 9 meses de edad, observan que la inmunización con 5 dosis de la vacuna trivalente desarrollaron altos niveles de anticuerpos, variaban de 88 al 98%, en sueros obtenidos a los 7 y 30 días después de la inmunización y que una sexta inmunización con OPV no modificaba estos niveles pero si se inmunizaba con la vacuna de poliovirus inactivados si aumentaban (Sutter, 2000). Otro estudio donde analizaron la prevalencia de anticuerpos en la población del norte de Grecia, después del esquema de vacunación (4 dosis a los 2, 4, 6 y 18 meses con refuerzo a los 4 y 6 años), encontraron que los niveles de anticuerpos se encontraban entre 83.1 y 92.1 % contra los tres tipos de virus, evaluada en personas (hombres y mujeres) de entre 3 meses hasta 70 años de edad, y que estos niveles permanecen estables en individuos de más de 50 años (Frantzidou, 2005)

A pesar de que ya existen vacunas de ADN en el mercado se debe tener cierta precaución al ser utilizada con respecto a su seguridad. Desde luego, grupos internacionales reguladores han cuestionado recientemente la seguridad de ciertas construcciones de ADN existentes y sus sistemas de producción (European Medicines Agency, 2003). Mientras el principal enfoque de la búsqueda realizada fue enfocado en su funcionalidad y mecanismos inmunológicos, también debe trabajarse en el aspecto de su seguridad. Cierta seguridad debe ser considerada para una apropiada elección de los elementos genéticos, de su producción en el huésped microbiano y de las condiciones de manufactura (Glenting, 2005). Las regiones de replicación contenidas

en los plásmidos permiten el mantenimiento de múltiples copias por célula hospedera y una estable herencia del plásmido durante el crecimiento bacteriano sin embargo la expresión incontrolada del gen puede inducir tolerancia inmunológica. Además la persistencia y la propagación incrementada del plásmido pueden dirigir a la transmisión a la línea germinal como resultado de la transfección de células espermáticas y ovocitos (European Medicines Agency, 2003; Gallot, 2002).

Por otro lado la mayoría de los plásmidos cuentan con resistencia a antibióticos, pero estos plásmidos podrían transformar la microflora y propagar la resistencia. (European Comisión, 2001; European Food Safety Authority, 2004; European Medicines Agency, 2003; Martínez, 2002; US Food and Drug Administration, 2004) Ya existen algunos sistemas que excluyen a los antibióticos (Cranenburgh, 2001; Madsen, 1996; Glenting, 2002). Otras son las secuencias de ADN específicas o los patrones de metilación que pueden inducir anticuerpos anti-ADN y dirigir a enfermedades sistémicas autoinmunes (Pisetsky, 2001; Gilkeson, 1989). Y ya existen estrategias para minimizar este efecto como son la omisión del esqueleto procarionte (Darquet, 1997) o el uso de esqueleto plasmídico derivado de ADN bacteriano de *Lactococcus lactis* (Glenting, 2002). Las regiones promotoras o enhancers provenientes de virus también representan un peligro pues algunas poblaciones ya han estado en contacto con estos virus y podrían causarles eventos de recombinación formando nuevas quimeras (Nacional Center for Infectious Diseases [<http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/cmvm.htm>]).

En este trabajo se quiso analizar si se induciría una respuesta contra proteínas virales expresadas en células tumorales a través de la transfección directa in vivo, que se sabe serían reconocidas por el sistema inmune que ya tuvo un primer encuentro con estos antígenos, sin embargo esto no fue así, dado a la baja eficiencia de transfección que en sí esta técnica tiene. Esto concuerda con trabajos donde reportan que solamente el 1-2% del plásmido inoculado sin vehículo es incorporado en las células (Davis, 1993<sub>a</sub>; Davis, 1993<sub>b</sub>) y con otros estudios, los cuales demuestran que se pierde gran parte del ADN desnudo al ser inoculado (Walther, 2005; Walther, 2006) y con una revisión que subraya que el principal problema de este tipo de metodología es conseguir que todas las células tumorales se encuentren transfectadas por estos vectores. Esto podría deberse a que la mayoría del ADN no puede atravesar barreras celulares como la membrana plasmática o la membrana nuclear (Tachibana, 2001; Munkonge, 2003), y es entonces degradado (Manthorpe, 1993; Kawase, 2003). Y en sí

lo que se trató de analizar fue el efecto “bystander”, en el cual la expresión del producto afecta a las células cercanas al sitio de inyección del plásmido en cuestión o por el daño causado en sí por la inyección, este efecto se ha observado primero cuando una variedad de infecciones bacteriales en algunos pacientes con cáncer dirigía a la regresión de sus tumores, luego Coley y colaboradores usaron una mezcla de toxinas bacterianas en un intento para inducir regresiones tumores (Coley, 1981; Coley 1893). Aunque la respuesta inmune inducida por los productos bacterianos también dirige a la estimulación de los componentes activos biológicamente hacia alrededor del antígeno que resulta en el daño hacia células en el área. Y tal daño del tejido es la base para la reacción de hipersensibilidad específica de antígeno. Esto es fácil de realizar si las células, microorganismos, células normales y tumores, están presentes en la cercanía de tal reacción, estos podrían ser dañados, como miradores inocentes, cerca de la respuesta inmune específica de antígeno. Klein y colaboradores produjeron una reacción de hipersensibilidad intensa retardada aplicando potentes sensibilizadores de contacto (dinitroclorobenceno) en varios tumores de piel (Klein, 1976). Otros sensibilizadores de contacto usados son Bacillus Calmette Guerin (Ikonspisov, 1972; McKeneally, 1976; Everall, 1975). Existen otros trabajos donde se busca este tipo de respuesta; por ejemplo, la expresión del gene de timidina cinasa del virus del herpes simple (Sun, 2002), inhibidores de metaloproteinasas (Tran, 2003), la expresión de la oxido nítrico reductasa II (Soler, 2000), la expresión de una glicoproteína de membrana fusogénica mutante del virus de leucemia del gibbon (Zhang, 2004).

Y por ello sólo es necesario aumentar el nivel de transfección para producir una transfección in vivo en la mayoría o en todas las células tumorales. Para llevar lo anterior existen diversas propuestas que involucran la transferencia genética para activar la respuesta antitumoral (Larin, 2004), y que proponen la utilización de otras formas de liberación o transferencia genética que aumenten la eficiencia de la transfección a través de la fractura transitoria de la membrana plasmática, lo cual facilita la entrada del ADN, puede ser llevado a cabo por bombardeo de partículas, electroporación o sonicación.

El bombardeo de partículas es también conocido como “gene gun”, es llevada por un shock de ondas de gas Helio comprimido, que aceleran partículas de oro o tungsteno cargadas de ADN de varios tamaños (1-5 $\mu$ m) a una gran velocidad (Cheng, 1993; Williams, 1991). El ADN que puede ser cargado va de 0.5 a 5 $\mu$ m por mg de oro. Esta fuerza es suficiente para penetrar barreras físicas, tales como paredes celulares,

membranas celulares y estrato corneo de la epidermis de mamíferos (Yang, 1999). La principal ventaja de esta técnica es que no requiere del uso de sistema de liberación complejos. No esta restringida al tipo celular o limitada por el tamaño del ADN que puede ser transferido, no hay riesgo de inmuniogenicidad o toxicidad y el plásmido puede ser reintroducido en las células cuantas veces sea necesario, otra ventaja es que podría liberarse múltiples genes en diferentes plásmidos. Se sabe aumenta la eficiencia de transfección así como la respuesta celular y humoral en tumores (Hahn, 2004; Oliveira, 1999; Tang, 1992; Fynan, 1993). Pero la respuesta inmune que prevalece es Th2. Varios laboratorios han mostrado que la transfección por gene gun de piel en ratones (Larsen, 1998) puede inducir respuesta inmune celular. La expresión puede ser mantenida arriba de un mes durante el cual células T CD8 son reclutadas (Johnson-Saliba, 2001) .Pruebas clínicas humanas están iniciadas con vacunas contra cáncer y varios tipos de linfomas (Weiner, 1999). La técnica “gene gun” es aplicada externamente y las partículas entran a través de la epidermis y pocas capas intradermales (Tanigawa. 2000), pero también se ha reportado en corazón (Nishizaki, 2000), hígado (Kuriyama, 2000) y cornea (Tanelian, 1997). Sin embargo su alto costo hace difícil de emplear comúnmente esta técnica. Otra desventaja es que la cantidad de ADN que puede ser cargada en las partículas es limitada.

La electroporación medía la entrada del gene por la disrupción transitoria de los lípidos de la membrana (Teissie, 1981). Los electrodos son puestos en el tejido de interés seguida de aplicación de un campo eléctrico externo dirigido para incrementar la conductividad de la membrana y la permeabilidad difusiva (Neumann, 1982), depende mucho del número, intensidad y duración de los pulsos eléctricos (Rols, 1990). Este método se ha utilizado en tumores, cerebro, piel, corazón (Cemazar, 2004; Djurovic, 2004; Goto, 2004; Ho, 2004; Luo, 2004; Maruyama, 2004; Otani, 2004). La electroporación es localizada, es decir solo una parte de la membrana es competente para la transferencia genética (Wolf, 1994). La electroporación dirige una respuesta antitumoral con daño transitorio en la piel (Maruyama, 2004; Goto, 2004; Goto, 2000; Li, 2002; Tamura, 2003). Puede ser aplicada *in vitro* a varios tipos celulares, en suspensión o en monocapas, pueden ser permeabilizadas todas (Rols, 1992). *In vivo* puede llevarse en pero intacto, el tejido o in situ aplicando los electrodos directamente en el tejido blanco (Maramatsu, 1998). Esta técnica podría favorecer la entrada del plásmido a células no blanco, por “efecto espectador”. Generalmente, la mayoría de los reportes muestra diferencias de 10 a 1000 veces entre la inyección directa de DNA y la

electroporación y en muchos casos, una amplia distribución de células transfectadas es lograda.

La sonicación media la transferencia genética *in vitro* e *in vivo* pero causa daño al tejido, inflamación y necrosis (Miller, 2002; Nozaki, 2003; Teupe, 2002; Tomita, 1992; Wasan, 1996). Esta técnica usa sonido de alta energía para romper la arquitectura del tejido y la integridad de la membrana celular. Específicamente, el ultrasonido causa daño reversible a la membrana celular, dirigiendo a un incremento transitorio de la porosidad de la membrana el cual facilita la entrada de grandes moléculas tales como el ADN plasmídico (Bao, 1998; Tachibana, 1999; Taniyama, 2002). Esta técnica media la transferencia genética *in vitro* e *in vivo*, pero causa daño de tejido, inflamación y necrosis (Miller, 2002; Nozaki, 2003; Teupe, 2002; Tomita, 1992; Wasan, 1996), Lo que ayuda a la destrucción del tumor (Miller, 2002). Sin embargo reportes demuestran que solo aumenta 15 veces la expresión del gene reportero en células de melanoma de ratón (Bao, 1998).

También puede usarse vectores químicos que median la entrada genética por fusión a la membrana o por endocitosis mediada por receptor, no tienen los efectos de los métodos físicos, sin embargo depende del tipo de conjugado usado y el método de administración pero son efectivos y de toxicidad baja (Nishikawa, 2001). Los vectores químicos se dividen en lipoplejos (basados en lípidos) y poliplexos (constituidos de polímeros orgánicos). Dentro de los primeros están los derivados del colesterol y diacilglicerol y poliaminas, son tolerados, fácil de producir y de bajo costo. Los poliplexos incluyen poli-L-lisina, orniteína, polietilenimina, quitosán y dendrímero (Liu, 2002; Kircheis, 1997). Sin embargo ambos exhiben toxicidad, especialmente cuando son administrados intravenosamente que puede ser reducida adicionando componentes hidrofílicos. (Mahato, 2005; Nishikawa, 2001; Ogris, 1999). Aunado a esto, también se puede modificar el vector para que pueda atravesar más fácilmente las barreras que limitan su entrada (proteínas del plasma, células sanguíneas, matriz extracelular, membranas celulares y nucleares) (Lechardeur, 2002; Azevedo, 1999; Ohlfest, 2005; Ogris, 2002). Sin embargo, estos aunque aumentan el nivel de transfección se sabe que al estar asociados al ADN inhiben la entrada al núcleo.

Otra forma de aumentar la transfección *in vivo* y hacerla más específica, células de melanoma, a través de la introducción de secuencias específicas de tejido como lo son Piel 17/gp 100, MART- 1/mela-A (Kawakami, 1995; Kawakami, 1994; Boon, 1996), MAGE-3 (Marchand, 1999). Pg75 de melanoma murino (Hirschowitz, 1998) o la



utilización de NLS secuencias de localización nuclear para el importe nuclear del plásmido de ADN una vez inyectado al citoplasma aumentando la eficiencia de expresión del producto; por ejemplo utilizando factores transcripcionales como GAL4 (Chan, 1998), proteína Rev del VHI-1 (Henderson, 1997), histonas (Jonson-Saliba, 2000) entre otras.

Por lo anterior, la técnica a utilizar para inducir una mayor transfección *in vivo* será la electroporación pues las propiedades histológicas de tumores de B16F1 permiten una mejor transfección utilizando esta técnica (Mesojednik, 2007). Además, esta técnica ya se ha probado en melanomas de ratón demostrando que la expresión del gene reportero aumento 42 veces así como la presencia de regresiones completas, esto fue dado por la apoptosis causada en si por la transfección sin la necesidad de la expresión de ADN (Heller, 2002; Zhang, 1996), en células de melanoma (Rols, 1998). Otro estudio demostró que la utilización de esta técnica en la inyección de DNA junto con un inhibidor de nucleasas aumenta la expresión 115 veces y se distribuye en el sitio de infección, lo que la hace de acción limitada a la epidermis (Glasspool-Malone, 2000; Zhang, 2002), y que la piel es el tejido principalmente transfectado por esta técnica, donde adipositos, fibroblastos, células que parecen células dendríticas dentro de la dermis y tejido subdermal son transfectados (Glasspool-Malone, 2000).

Con respecto a la sonoporación, aunque ofrece mayores ventajas, un estudio reportó que el uso de esta técnica solo aumenta 15 veces la expresión del gene reportero en células de melanoma (Bao, 1998), por lo que no sería ideal elegirla.

## **CONCLUSIONES**

- 1) El tratamiento de tumores *in vivo* con los plásmidos pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4 separados y en combinación no induce un efecto inhibitorio en el crecimiento tumoral.
- 2) El nivel de transfección *in vivo* de masas tumorales con ADN desnudo es bajo (0-4.6%).
- 3) La expresión de las proteínas del virus de la polio no se detectó en los tumores tratados *in vivo*.
- 4) Los ratones inmunizados con la vacuna oral anti-poliomielítica son capaces de desarrollar anticuerpos a nivel sistémico a partir de la segunda inmunización.
- 5) Los anticuerpos séricos inducidos por la inmunización con la vacuna oral anti-poliomielítica son capaces de neutralizar parcialmente la infección por virus de la polio en células HeLa.
- 6) La inoculación directa de los plásmidos pDISVP1, pDISVP2 y pDISVP4 desnudos en la masa tumoral no tuvo el efecto “bystander” esperado dado la baja transfección que en sí tiene esta técnica.

## **PERSPECTIVAS**

- Tratar tumores de ratones C57BL6 con los plásmidos construidos junto con un inhibidor de nucleasas utilizando la técnica de electroporación o utilizar la secuencia antigénica de cada VP's, que sea compartida entre los tres tipos de poliovirus y confirmar su actividad antigénica.
- Analizar la respuesta celular en ratones vacunados y definir la población linfocítica activada así como el perfil de citocinas.

## ***APÉNDICES***

### **APÉNDICE 1**

#### **Medio LB**

Para preparar un litro de LB

A 950ml de agua bidestilada se le adicionó:

Triptona de caseína 10g.

Extracto de levadura 5g.

NaCl 10g.

Se agitó el soluto hasta que se disolvió, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10N, posteriormente se ajustó el volumen a un litro con agua bidestilada, se esterilizó por autoclave durante 20 minutos y se dejó enfriar. Para su posterior almacenamiento a 4°C.

#### **Preparación de placas de agar-Ampicilina o Kanamicina**

Al medio LB se le agregó 2.5 gr. de agar bacteriológico, para posteriormente esterilizarse en autoclave por 20 minutos, y se dejó enfriar a 50 °C, para agregar Ampicilina o Kanamicina: ampicilina (50 mg/ml) o kanamicina (10mg/ml), y se vació en cajas petri para dejar solidificar. Las cajas se almacenaron a 4°C.

### **APÉNDICE 2**

#### **Tris-EDTA (TE)**

Para preparar 100ml:

Tris-HCl 1M pH: 7.4

EDTA 0.5M pH: 8.0

Se adicionó en 80ml de agua bidestilada 1ml de Tris-HCl pH: 7.4 para que la solución quedará a una concentración de 10mM, se mantuvo en agitación constante para posteriormente adicionarle 20µl de EDTA 0.5M pH: 8.0, para que la solución final quedará a una concentración 1mM, una vez llevado a cabo lo anterior se aforó y se vació en un recipiente.

### **APÉNDICE 3**

#### **TBE 5x**

27.25g. Tris base

13.90g. Ácido bórico

1.85g. EDTA

#### **Para preparar un litro:**

A 500ml de agua bidestilada se le adicionaron los reactivos, se agitó hasta disolver, se ajustó pH a 8.0, se aforo a 1 litro y se vació en recipientes y se guardaron a 4°C.

### **BROMURO DE ETIDIDO (10mg/ml)**

#### **Para preparar 100ml**

Se adicionó 1g. de bromuro de etidio en 100ml de agua bidestilada, se mantuvo en agitación constante durante varias horas hasta que estuviera totalmente disuelto. Posteriormente se vació a un recipiente protegido de la luz.

### **APÉNDICE 4**

#### **BUFFER DE CARGA**

0.25 % de azul de bromofenol

0.25% de xilen cianol

30% de glicerol en agua

#### **Para preparar 10 ml**

Se adicionó 25µg de Azul de bromofenol, posteriormente 25µg de xilen cianol y finalmente 3ml de glicerol y se aforo a 10ml con agua bidestilada. Durante el tiempo de preparación estuvo en constante movimiento la solución. Se vació en un recipiente color ambar y se almacenó a temperatura ambiente.

### **APÉNDICE 5**

#### **TAE 1X**

4.84g. Tris base 1L.

1.14ml de ácido acético glacial

2ml EDTA 0.5M pH: 8.0

Se agitó hasta disolver y se guardo a 4°C.

## **APÉNDICE 6**

### **PBS 1X**

8g. de NaCl

0.2g. de KCl

1.44g. de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.24g. de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Se agitó el soluto hasta que se disolvió, se ajustó el pH a 7.2 con HCl concentrado, posteriormente se ajustó el volumen a un litro con agua bidestilada, se esterilizó y se almacenó a 4°C.

## **APÉNDICE 7**

MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5bromuro difeniltetrazolio} 1mg/ml en PBS

### **Para preparar 50ml**

Se adicionó 0.05g. de MTT en 50ml de PBS estéril, se mantuvo en agitación constante hasta que estuviera totalmente disuelto. Posteriormente se filtró en condiciones estériles y se guardó a 4°C.

## **APÉNDICE 8**

### **TBS 1X**

Para preparar un litro de TBS:

Tris Base 6.5g.

NaCl 8.7g.

KCl 0.2g.

Se agitó el soluto hasta que se disolvió, se ajustó el pH a 7.6 con HCl concentrado, posteriormente se ajustó el volumen a un litro con agua bidestilada y se almacenó a 4°C.

Nota: Para preparar TBS-Tween al 0.05% en 100 ml se adiciona 50 µl de Tween 20 (Sigma).

## **APÉNDICE 9**

### **Buffer de digestión**

Tris-HCl 100mM

EDTA 25mM

SDS 0.5%

NaCl 100mM

Se adicionaron los reactivos a un recipiente, se agitaron, se ajustó el pH a 8.0 con HCl concentrado, posteriormente se ajustó a un volumen final de 100ml con agua bidestilada, se esterilizó y se guardó a temperatura ambiente.

### **APÉNDICE 10**

#### **BUFFER DE LISIS.**

Tris-HCl 10mM pH= 7.4

NaCl 50mM

EDTA 5mM

Tritón x-100 1%

SDS 0.05%

Se adicionaron todos los reactivos y se agitaron hasta disolver, se esterilizó la solución y se almacenó a temperatura ambiente.

### **APÉNDICE 11**

#### **SOLUCIÓN DE CARGA**

##### **SDS-PAGE double strength sample buffer**

2g. glicerol

1g. SDS

2.5ml stacking gel buffer

150µl azul de bromofenol 1%

5ml ditiotreitól (DTT) 100Mm

Se adicionaron todos los reactivos a un recipiente, se agitó constantemente a hasta disolver y se aforó a 10ml con agua bidestilada y se guardó a 4°C.

### **APÉNDICE 12**

Buffer's para preparar los geles del Western Blot

#### **0.5M Stacking gel Buffer**

12g. Tris-base

Se ajustó el pH a 6.8 con HCl y se llevó a un volumen final de 200ml con agua bidestilada, se esterilizó y se almacenó a temperatura ambiente.

### **1.5M Resolving gel Buffer**

9g. Tris-HCl

29.4g. tris-base

Se disolvió el soluto en 100ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 8.7 con HCl y se aforó a 200ml, se esterilizó y se guardó a temperatura ambiente.

Buffer's para correr y transferir.

### **SDS-PAGE Running Buffer 5X**

94g. glicina

15.15g. Tris base

5g. SDS

Se adicionó agua bidestilada para disolver, se ajustó el pH a 8.1- 8.3 y se aforó a 5 litros y se guardó a 4°C...

### **SDS-PAGE Transfer Buffer 10x**

10.93g. tris-HCl

90g. glicina

Se disolvió el soluto en 1000ml de agua bidestilada y se almacenó a 4°C.



## **BIBLIOGRAFÍA**

- Ahmed R, Gray D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*. 272:54-60.
- Allison AC (1970). Tumour development following immunosuppression. *Proc R Soc Med*. 63:1077-80.
- Ansardi DC, Porter DC, Morrow C. (1992). Myristylation of poliovirus capsid precursor P1 is required for assembly of subviral particles. *J Virol*. 66:4556-63.
- Azevedo V, Levitus G, Miyoshi A, Candido AL, Goes AM, Oliveira SC. (1999). Main features of DNA –based immunization vectors. *Braz J Med Biol Res*. 32:147-153.
- Bruneau P, Blondel B, Crainic R, Horodniceanu F, Girard M. (1983). Poliovirus type 1 capsid polypeptides: absence of a free form in the cytoplasm of infected HeLa cells. *Ann Virol Inst Pasteur*. 134E:151-164.
- Bale SJ, Chakravarti A, Greene MH (1986). Cutaneous malignant melanoma and familial dysplastic nevi: evidence for autosomal dominance and pleiotropy. *Am J Hum Genet*. 38:188-196.
- Ballestar E, Esteller M. (2008). Chapter 9 epigenetic gene regulation in cancer. *Adv Genet*. 61:247-67.
- Bane HN, Conrad JT, Tarnowski GS. (1957). Combination therapy of malignant tumors with ionizing radiations and chemicals; a review. *Cancer Res*. 17:551-66.
- Bao S, Thrall BD, Gies RA, Miller DL. (1998) In vivo transfection of melanoma cells by lithotripter shock waves. *Cancer Res*. 58(2):219-21.
- Bataille V. (2003). Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer*. 39: 1341–1347.
- Belmar-Lopez C, Mancheno-Corvo P, Saornil MA, Baril P, Vassaux G, Quintanilla M, Martin-Duque P. (2008). Uveal vs. cutaneous melanoma. Origins and causes of the differences. *Clin Transl Oncol*. 10:137-42.
- Benjamini E, Rennick DM. (1979). Cancer immunotherapy: facts and fancy. *CA Cancer J Clin*. 29:362-70.

- Bergen M, Chen R, Gonzalez R. (2003). Efficacy and safety of HLA-B7/beta-2 microglobulin plasmid DNA/lipid complex (Allovectin-7) in patients with metastatic melanoma. *Expert Opin Biol Ther.* 3:377-84.
- Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. (2004). Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer.* 4:737-47.
- Billings FT Jr, Collins RD. (2005). Theodore E. Woodward Award: The devastating backlash of a dread disease: poliomyelitis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 116:57-62; discussion 63.
- Boone C, Blackman K, Brandchaft P. (1971) Tumour immunity induced in mice with cell-free homogenates of influenza virus-infected tumour cells. *Nature.* 231(5300):265-6.
- Boon T, Van der Bruggen P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med.* 183:725-729.
- Boyland E. (1946). Experiments on the chemotherapy of cancer: 6. The effect of aromatic bases. *Biochem J.* 40:55-8.
- Boyle<sub>a</sub> JS, Koniaras C, Lew AM. (1997) Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *Int Immunol.* 9(12):1897-906.
- Boyle<sub>b</sub> JS, Silva A, Brady JL, Lew AM. (1997) DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(26):14626-31.
- Bremers AJ, Rutgers EJ, van de Velde CJ. (1999). Cancer surgery: the last 25 years. *Cancer Treat Rev.* 25:333-53.
- Browning M, Dunnion D. (1997). HLA and cancer: implications for cancer immunotherapy and vaccination. *Eur J Immunogenet.* 24:293-312.
- Buisman AM, Sonsma JA, van Wijk MG, Vermeulen JP, Roholl PJ, Kimman TG. (2003) Pathogenesis of poliovirus infection in PVRTg mice: poliovirus replicates in peritoneal macrophages. *J Gen Virol.* 84(Pt 10):2819-28.
- Burdick CG. (1937). William Bradley Coley 1862-1936. *Ann Surg.* 105:152-5.

- Bystryn JC, Zeleniuch-Jacquotte A, Oratz R, Shapiro RL, Harris MN, Roses DF. (2001). Double-blind trial of a polyvalent, shed-antigen melanoma vaccine. *Clin Cancer Res.* 7:1882-7.
- Cameron D. (1952). Discussion on infantile paralysis. *Proc R Soc Med.* 45: 380-3.
- Caldwell JM, Chen Y, Schollaert KL, Theis JF, Babcock GF, Newlon CS, Sanchez Y. (2008). Orchestration of the S-phase and DNA damage checkpoint pathways by replication forks from early origins. *J Cell Biol.* 180:1073-86.
- Cemazar M, Wilson I, Dachs GU, Tozer GM, Sersa G. (2004) Direct visualization of electroporation-assisted in vivo gene delivery to tumors using intravital microscopy - spatial and time dependent distribution. *BMC Cancer.* 4:81.
- Chalmers AH, Lavin M, Atisoontomkul S, Mansbridge J, Kidson C. (1976). Resistance of human melanoma cells to ultraviolet radiation. *Cancer Res.* 36:1930-4.
- Chan CK, HubnerS, Hu W, Jans DA. (1998). Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery. *Gene Ther* 5:1204-1212.
- Chaudru V, Chompret A, Bressac-de Paillerets B, Spatz A, Avril MF, Demenais F. (2004). Influence of genes, nevi, and sun sensitivity on melanoma risk in a family sample unselected by family history and in melanoma-prone families. *J Natl Cancer Inst.* 96:785–95.
- Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS. (1993) In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(10):4455-9.
- Chen L, Li G, Tang L, Wang J, Ge XR. (2002) The inhibition of lung cancer cell growth by intracellular immunization with LC-1 ScFv. *Cell Res.* 12(1):47-54.
- Coley WB. (1891). Contributions to the knowledge of sarcoma. *Ann Surg* 14:199-220.
- Coley WB. (1893). Treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas with a report of 10 cases. *Med Res* 43:60-61.

- Coman DR. (1953). Mechanisms responsible for the origin and distribution of blood-borne tumor metastases:a review. *Cancer Res.* 13: 397-404.
- Cranenburgh RM, Hanak JA, Williams SG, Sherratt DJ. (2001). *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acids Res.* 29:E26.
- Crotty S, Hix L, Sigal LJ, Andino R. (2002) Poliovirus pathogenesis in a new poliovirus receptor transgenic mouse model: age-dependent paralysis and a mucosal route of infection. *J Gen Virol.* 83(Pt 7):1707-20.
- Darquet AM, Cameron B, Wils P, Scherman D, Crouzet J. (1997). A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther.* 4:1341-49.
- Davis HL, Demeneix B, Quantin B, Coulombe J, Whalen RG. (1993). Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther.* 4:733-40.
- Davis HL, Michel ML, Mancini M, Schleef M, Whalen RG. (1994) Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine.* 12(16):1503-9.
- Davis HL, Whalen RG, Demeneix BA. (1993). Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther.* 4:151-9.
- Davis NC, McLeod R, Beardmore G, Little J, Quinn R. (1973). Pigmented Skin Tumors. *CA Cancer J Clin.* 23:160-170.
- Deckers PJ, Edgerton BW, Thomas BS, Pilch YH. (1971). The adoptive transfer of concomitant immunity to murine tumor isografts with spleen cells from tumor-bearing animals. *Cancer Res.* 31:734-42.
- Delaney G, Barton M, Jacob S. (2004). Estimation of an optimal radiotherapy utilization rate for melanoma: a review of the evidence. *Cancer.* 100:1293-301.
- Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer.* 104:1129-37.
- Delves PJ. *Cellular Immunology.* (1994). Bios Scientific Publishers. Oxford United Kingdom. Inc, Academic Pres. San Diego, California. 382- 439 pp.

- Destombes J, Couderc T, Thiesson D, Girard S, Wilt SG, Blondel B. (1997). Persistent poliovirus infection in mouse motoneurons. *J Virol.* 71:1621-8.
- Diffey BL, Langtry JA. (2005). Skin cancer incidence and the ageing population. *Br J Dermatol.* 153:679-80.
- Djurovic S, Iversen N, Jeansson S, Hoover F, Christensen G. (2004) Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes. *Mol Biotechnol.* 28(1):21-32.
- Donnelly JJ, Friedman A, Martinez D, Montgomery DL, Shiver JW, Motzel SL, Ulmer JB, Liu MA. (1995) Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nat Med.* 1(6):583-7.
- Dunman PM, Nesin M. (2003). Passive immunization as prophylaxis: when and where will this work? *Curr Opin Pharmacol.* 3:486-96.
- European Comisión: Communication from the Comisión on a community strategy against antimicrobial resistance. 2001. COM (2001) 333 final.
- European Food Safety Authority : Working Document on the updating of the criteria used in the assesment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. (2004).
- European Medicines Agency: Report from the ad hoc meeting of CPMP Gene Therapy Expert Group 2003. 23-24 January (2003). EMEA-5382-03-final.
- Evans AS. (1991). *Viral Infection of Humans Epidemiology and Control.* Tercera Edición. Plenum Medical Book Company. New York, N. Y. 191-263 pp.
- Everall JD, O'Doherty CJ, Wand J, Dowd PM. (1975) Treatment of primary melanoma by intralesional vaccinia before excision. *Lancet.* 2(7935):583-6.
- Fidler IJ. (1978). Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 38: 2651-2660.
- Fiore L, Ridolfi B, Genovese D, Buttinelli G, Lucioli S, Lahm A, Ruggeri FM. (1997). Poliovirus Sabin type 1 neutralization epitopes recognized by immunoglobulin A monoclonal antibodies. *J Virol.* 71:6905-6912.
- Ford DJ, Ropka SL, Collins GH, Jubelt B. (2002). The neuropathology observed in wild-type mice inoculated with human poliovirus mirrors human paralytic poliomyelitis. *Microb Pathog.* 33:97-107.

- Forns X, Emerson SU, Tobin GJ, Mushahwar IK, Purcell RH, Bukh J. (1999) DNA immunization of mice and macaques with plasmids encoding hepatitis C virus envelope E2 protein expressed intracellularly and on the cell surface. *Vaccine*. 17(15-16):1992-2002.
- Frei E 3<sup>rd</sup>. (1985). Curative cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 45:6523-37.
- Freistadt MS, Racaniello VR. (1991) Mutational analysis of the cellular receptor for poliovirus. *J Virol*. 65(7):3873-6.
- Frantidou F, Diza E, Halkia D, Antoniadis A. (2005). A seroprevalence study of poliovirus antibody in the population of northern Greece. *Clin Microbiol Infect*. 11:68-71.
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. (1993). DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:11478-82.
- Gagnet M, Guardiola E, Dufresne A, Pivot X. (2003). [Epidermal growth factor receptors (EGFR): a new target for anticancer therapy]. *Cancer Radiother*. 7:195-9.
- Gallot D, Seifer I, Lemery D, Bignon YJ. (2002). Systemic difusión including germ cells alter plasmidic in utero gene transfer in the rat. *Fetal Diagn Ther*. 17:157-162.
- Gendon luZ, Diskina BS. (1964). [Studies on the resistance to some physico-chemical factors of native viruses and RNA of genetically distinct poliomyelitis virus strains.] *Vopr Virusol*.60:661-7.
- Gilkeson GS, Grudier JP, Pisetsky DS. (1989). The antibody response of normal mice to immunization with single- stranded DNA of various species origin. *Clin Immunol Immunopathol*. 51:362-371.
- Gillette RW, Boone CW. (1976) Augmented immunogenicity of tumor cell membranes produced by surface budding viruses: parameters of optimal immunization. *Int J Cancer*. 18(2):216-22.
- Glasspool-Malone J, Somaiari S, Drabick JJ, Malone RW (2000). Efficient nonviral cutaneous transfection. *Mol Ther*. 2(2):140-6.
- Glenting J, Madsen SM, Vrang A, Fomsgaard A, Israelsen H. (2002). A plasmid selection system in *Lactococcus lactis* and its use for gene expresión in *L. lactis* and human kidney fibroblasts. *Appl Environ Microbiol*. 68:5051-56.

- Glenting J, Wessels S. (2005). Ensuring safety of DNA vaccines. *Microb Cell Fact.* 4:26.
- Goldman L, Galante M. (1964). Surgical treatment of malignant disease. *Calif Med.* 100:402-5.
- Goto T, Nishi T, Tamura T, Dev SB, Takeshima H, Kochi M, Kuratsu J, Sakata T, Ushio Y. (2004). Combination electro-gene therapy using herpes virus thymidine kinase and interleukin-12 expression plasmids is highly efficient against murine carcinomas in vivo. *Mol Ther.* 10:929-37.
- Goto T, Nishi T, Tamura T, Dev SB, Takeshima H, Kochi M, Yoshizato K, Kuratsu J, Sakata T, Hofmann GA, Ushio Y. (2000). Highly efficient electrogene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene, *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:354-9.
- Greene MH, Goldin LR, Clark WH Jr, Lovrien E, Kraemer KH, Tucker MA, Elder DE, Fraser MC, Rowe S. (1983). Familial cutaneous malignant melanoma: autosomal dominant trait possibly linked to the Rh locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:6071-5.
- Gromeier M, Wimmer E. (1998). Mechanism of injury-provoked poliomyelitis. *J Virol.* 72:5056-60.
- Hahn UK, Alex M, Czerny CP, Böhm R, Beyer W. (2004) Protection of mice against challenge with *Bacillus anthracis* STI spores after DNA vaccination. *Int J Med Microbiol.* 294(1):35-44.
- Harnack K. (1974) [Smallpox vaccination in skin diseases] *Dermatol Monatschr.* 160(3):183-93.
- Harrop<sub>a</sub> R, Carroll MW. (2006). Viral vectors for cancer immunotherapy. *Front Biosci.* 11:804-17.
- Harrop<sub>b</sub> R, John J, Carroll MW. (2006). Recombinant viral vectors: cancer vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 58:931-47.
- Heller LC, Coppola D. (2002) Electrically mediated delivery of vector plasmid DNA elicits an antitumor effect. *Gene Ther.* 9:1321-5.
- Henderson BR, Percipalle P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* 274:693-707.

- Herrmann WP, Tritsch H. (1970) [The treatment of melanoma metastases with smallpox vaccine and Freund's adjuvant] *Munch Med Wochenschr.* 112(42):1916.
- Herremans TM, Reimerink JH, Buisman AM, Kimman TG, Koopmans MP. (1999). Induction of mucosal immunity by inactivated poliovirus vaccine is dependent on previous mucosal contact with live virus. *J Immunol.* 162:5011-5018.
- Hersey P. (2003). Adjuvant therapy for high-risk primary and resected metastatic melanoma. *Inter Med J.* 33:33-43.
- Hinman AR, Koplan JP, Orenstein WA, Brink EW, Nkowane BM. (1988). Live or inactivated poliomyelitis vaccine: an analysis of benefits and risks. *Am J Public Health.* 78:291-5.
- Hirschowitz, EA, Leonard S, Song W, Ferris B, Leopold PL, Lewis J, Bowne WB, Wang S, Houghton AN, Crystal RG.(1998). Adenovirus-mediated expression of melanoma antigen gp75 as immunotherapy for metastatic melanoma. *Gene Ther.* 5:975-983.
- Ho SH, Hahn W, Lee HJ, Kim DS, Jeong JG, Kim S, Yu SS, Jeon ES, Kim S, Kim JM. (2004) Protection against collagen-induced arthritis by electrotransfer of an expression plasmid for the interleukin-4. *Biochem Biophys Res Commun.* 321(4):759-66.
- Horie H, Koike S, Kurata T, Sato-Yoshida Y, Ise I, Ota Y, Abe S, Hioki K, Kato H, Taya C, Nomera T, Hashizume S, Yonekawa H, Nomoto A. (1994). Transgenic mice carrying the human poliovirus receptor: new animal models for study of poliovirus neurovirulence. *J Virol.* 68:681-8.
- Howley, PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, Knipe DM, Fields BN (2001) *virology*. Philadelphia: lippincott Williams & wilkins. 4<sup>th</sup> ed. 685-775.
- Hsueh EC, Essner R, Foshag LJ, Ollila DW, Gammon G, O'Day SJ, Boasberg PD, Stern SL, Ye X, Morton DL. (2002). Prolonged survival after complete resection of disseminated melanoma and active immunotherapy with a therapeutic cancer vaccine. *J Clin Oncol.* 20:4549-54.
- Hsueh EC, Morton DL. (2003). Antigen-based immunotherapy of melanoma: Canvaxin therapeutic polyvalent cancer vaccine. *Semin Cancer Biol.*13:401-7.



- <http://www.childrenshospital.org/research/Site2029/mainpageS2029P6sublevel7Flevel14.html>
- [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/infosisner\\_polio.html](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/infosisner_polio.html)
- [www.fihu-diagnostico.org.pe/.../39-41.html](http://www.fihu-diagnostico.org.pe/.../39-41.html)
- <http://www.lehigh.edu/~jas0/V05.html>
- <http://www.microbes-edu.org/etudiant/virus.html>
- <http://www.microbiologybytes.com/virology/3035pics/Picornas2.gif>
- Hussein MR. (2005). Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol.* 2005; 32:191–205.
- Ihse I. (2003). The volume-outcome relationship in cancer surgery: a hard sell. *Ann Surg.* 238:777-81.
- Ikonopisov RL. (1972) The rationale of immunostimulation procedures in the therapeutic approach to malignant melanoma of the skin. *Tumor.* 57:121-127.
- Ito K, Morita T, Sieber-Blum M. (1993). In vitro clonal analysis of mouse neural crest development. *Dev Biol.* 157:517-25.
- Jackson R. (1968). Origin and Development of Malignant Melanoma of the Skin. *Can Med Assoc J.* 99:1-6.
- Jäger D, Jäger E, Knuth A. (2001). Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J Clin Pathol.* 54:669-74.
- John TJ. (1984). Immune response of neonates to oral poliomyelitis vaccine. *Br Med J (Clin Res Ed).* 289:881.
- Johnson-Saliba M, Jans DA. (2001) Gene therapy: optimising DNA delivery to the nucleus. *Curr Drug Targets.* 2:371-99.
- Johnson-Saliba M, Siddon NA, Clarkson M J, Tremethick DJ, Jans DA. (2000). Distinct importin recognition properties of histones and chromatin assembly factors. *FEBS Lett* 467:169-174.
- Jubelt B. (2004). Post-Polio Syndrome. *Curr Treat Options Neurol.* 6:87-93.
- June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today.* 15: 321-331.
- Kammula US, White DE, Rosenberg SA. (1998). Trends in the safety of high dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer. *Cancer:* 83:797-805.

- Katrak K, Mahon BP, Minor PD, Mills KH. (1991). Cellular and humoral immune responses to poliovirus in mice: a role for helper T cells in heterotypic immunity to poliovirus. *J Gen Virol.* 72:1093-8.
- Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Appella E, Rosenberg SA. (1995). Recognition multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression. *J Immunol.* 154:3961-3968.
- Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins Pf, Rivoltini L, Yannelli Jr, Appella E, Rosenberg SA. (1994). Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2 restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J exp Med* 180:347-352.
- Kawase A, Nomura T, Yasuda K, Kobayashi N, Hashida M, Takakura Y. (2003). Disposition and gene expression characteristics in solid tumors and skeletal muscle after direct injection of naked plasmid DNA in mice. *J Pharm Sci.* 92:1295-304.
- Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, Buchberger M, Wagner E. (1997). Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther.* 4:409-18.
- Klein E, Holtermann O, Milgrom H, Case RW, Klein D, Rosner D, Djerassi I. (1976). Immunotherapy for accessible tumors utilizing delayed hypersensitivity reactions and separated components of the immune system. *Med Clin North Am.* 60:389-418.
- Klone W, Lennartz H. (1955). [Isolation and classification of poliomyelitis virus strains.] *Z Hyg Infektionskr.* 141:457-9.
- Koike S. (1993) [Poliovirus infection in the transgenic mouse model] *Jikken Dobutsu.* 42:296-9.
- Koike S, Horie H, Ise I, Okitsu A, Yoshida M, Iizuka N, Takeuchi K, Takegami T, Nomoto A. (1990) The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J.* 9:3217-24.
- Koike S, Taya C, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, Nomoto A. (1991). Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:951-5.

- Kominsky SL, Torres BA, Hobeika AC, Lake FA, Johnson HM. (2001). Superantigen enhanced protection against a weak tumor-specific melanoma antigen: implications for prophylactic vaccination against cancer. *Int J Cancer*. 94:834-41.
- Kopf AW. (1975) Immunotherapy for human malignant melanoma. *South Med J*. 68(4):495-503.
- Krickler A, Armstrong BK, Goumas C, Litchfield M, Begg CB, Hummer AJ, Marrett LD, Theis B, Millikan RC, Thomas N, Culver HA, Gallagher RP, Dwyer T, Rebbeck TR, Kanetsky PA, Busam K, From L, Mujumdar U, Zanetti R, Berwick M; for the GEM Study Group. (2007). Ambient UV, personal sun exposure and risk of multiple primary melanomas. *Cancer Causes Control*. 18:295-304.
- Kutubuddin<sub>a</sub> M, Simons J, Chow M. (1992). Identification of T-helper epitopes in the VP1 capsid protein of poliovirus. *J Virol*. 66:3042-3047.
- Kutubuddin<sub>b</sub> M, Simons J, Chow M. (1992) Poliovirus-specific major histocompatibility complex class I-restricted cytolytic T-cell epitopes in mice localize to neutralizing antigenic regions. *J Virol*. 66(10):5967-74.
- Kuriyama S, Mitoro A, Tsujinoue H, Nakatani T, Yoshiji H, Tsujimoto T, Yamazaki M, Fukui H. (2000) Particle-mediated gene transfer into murine livers using a newly developed gene gun. *Gene Ther*. 7(13):1132-6.
- Larin SS, Georgiev GP, Kiselev SL. (2004). Gene transfer approaches in cancer immunotherapy. *Gene Ther*. 11Suppl. 1:S18-S25.
- Larsen DL, Dybdahl-Sissoko N, McGregor MW, Drape R, Neumann V, Swain WF, Lunn DP, Olsen CW. (1998) Coadministration of DNA encoding interleukin-6 and hemagglutinin confers protection from influenza virus challenge in mice. *J Virol*. 72:1704-8.
- Larsen GR, Anderson CW, Dorner AJ, Semler BL, Wimmer E. (1982). Cleavage sites within the poliovirus capsid protein precursors. *J Virol*. 41:340-4.
- Lechardeur D, Lukacs GL. (2002). Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr Gene Ther*. 2:183-94.
- Leclerc C, Deriaud E, Mimic V, van der Werf S. (1991). Identification of a T-cell epitope adjacent to neutralization antigenic site 1 of poliovirus type 1.

J Virol. 65:711-718.

- Li S, Zhang X, Xia X. (2002). Regresión of tumor growth and induction of long-term antitumor memory by interleukin 12 electro-gene therapy. J Natl Cancer Inst. 94:762-8.
- Lieberman R, Wybran J, Epstein W. (1975) The immunologic and histopathologic changes of BCG-mediated tumor regression in patients with malignant melanoma. Cancer. 35(3):756-77.
- Lindelof B, Sigurgeirsson B, Gabel H, Stern RS. (2000). Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. Br J Dermatol. 143:513-9.
- Lindenmann J. (1970) Immunogenicity of oncolysates obtained from Ehrlich ascites tumors infected with vesicular stomatitis virus. Arch Gesamte Virusforsch. 31(1):61-70.
- Lindenmann J. (1974) Viruses as immunological adjuvants in cancer. Biochim Biophys Acta. 355(1):49-75.
- Liu F, Huang L. (2002). Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. J Control Rel. 78:259-66.
- Liu MA, Yasutomi Y, Davies ME, Perry HC, Freed DC, Letvin NL, Shiver JW. (1996) Vaccination of mice and nonhuman primates using HIV-gene-containing DNA. Antibiot Chemother. 48:100-4.
- Luo J, Redies C. (2004) Overexpression of genes in Purkinje cells in the embryonic chicken cerebellum by in vivo electroporation. J Neurosci Methods. 139(2):241-5.
- Madsen SM, Albrechtsen B, Hansen EB, Israelsen H. (1996). Cloning and transcriptional análisis of two threonine biosynthetic genes from Lactococcus lactis MG1614. J Bacterial. 178:3689-94.
- Mahato RI. (2005). Water insoluble and soluble lipids for gene delivery. Adv Drug Deliv Rev. 57:699-712.
- Mahon BP, Katrak K, Mills KH. (1992). Antigenic sequences of poliovirus recognized by T cells: serotype-specific epitopes on VP1 and VP3 and cross-reactive epitopes on VP4 defined by using CD4+ T-cell clones. J Virol. 66:7012-7020.

- Mahon BP, Katrak K, Nomoto A, Macadam AJ, Minor PD, Mills KH. (1995) Poliovirus-specific CD4+ Th1 clones with both cytotoxic and helper activity mediate protective humoral immunity against a lethal poliovirus infection in transgenic mice expressing the human poliovirus receptor. *J Exp Med.* 181:1285-92.
- Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith, Dwarki V. (1993). Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther.* 4:419–431.
- Muramatsu T, Nakamura A, Park HM. (1998) In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review). *Int J Mol Med.* 1(1):55-62.
- Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dréno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Boursdieu A, Vanwijck R, Liénard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jäger E, De Greve J, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, Boon T. (1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene a MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer.* 80:219-230.
- Marshall MS. (1955). The Salk vaccine. *Calif Med.* 83:383-6.
- Martinez JL, Baquero F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev.* 15:647-679.
- Maruyama H, Miyazaki J, Gejyo F. (2004). Epidermis-targeted gene transfer using in vivo electroporation. *Methods Mol Biol.* 289:431-6.
- McCarthy EF. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J.* 26:154-8.
- McKneally MG, Maver C, Kausel HW. (1976) Regional immunotherapy of lung cancer with intrapleural BCG. *Lancet I:* 377-379.
- Mesojednik S, Pavlin D, Sersa G, Coer A, Kranjc S, Grosel A, Tevz G, Cemazar M. (2007). The effect of the histological properties of tumors on transfection efficiency of electrically assisted gene delivery to solid tumors in mice. *Gene Ther.* 14:1261-9.

- Meyskens FL Jr, Ransohoff DF. (2006). Predicting risk for the appearance of melanoma. *J Clin Oncol.* 24:3522-3.
- Miller DL, Pislaru SV, Greenleaf JE. (2002). Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation. *Somat Cell Mol Genet* 27:115-34.
- Minor P D. (1996). Poliovirus biology. *Structure.* 4:775-778.
- Mintz B. (1967). Gene control of mammalian pigmentary differentiation. I. Clonal origin of melanocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 58:344-51.
- Munkonge FM, Dean DA, Hillery E, Griesenbach U, Alton EW. (2003). Emerging significance of plasmid DNA nuclear import in gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 55:749-60.
- Nacional Center for Infectious Diseases [<http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/cmvm.htm>].
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1(7):841-5.
- Nishikawa M, Huang L. (2001). Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther.* 12:861-70.
- Nishizaki K, Mazda O, Dohi Y, Satoh E, Kawata T, Mizuguchi K, Yonemasu K, Kitamura S, Taniguchi S. (2000) In vivo gene transfer into rat hearts with Epstein-Barr virus-based episomal vectors using a gene gun. *Transplant Proc.* 32(7):2413-4.
- Nozaki T, Ogawa R, Feril LB Jr, Kagiya G, Fuse H, Kondo T. (2003). Enhancement of ultrasound-mediated gene transfection by membrana modification. *J Gene Med.* 5:1046-55.
- Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, Wagner E. (1999). PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* 6:595-605.
- Ogris M, Wagner E. (2002). Targeting tumors with non-viral gene delivery systems. *Drug Discov Today.* 7:479-85.
- Ohka S, Nomoto A. (2001). Recent insights into poliovirus pathogenesis. *Trends Microbiol.* 9:501-506.

- Ohlfest JR, Freese AB, Largaespada DA. (2005). Nonviral vectors for cancer gene therapy: prospects for integrating vectors and combination therapies. *Curr Gene Ther.* 5:629-41.
- Onuigbo WI. (1962). Historical trends in cancer surgery. *Med Hist.* 6:154-61.
- Oliveira SC, Rosinha GM, de-Brito CF, Fonseca CT, Afonso RR, Costa MC, Goes AM, Rech EL, Azevedo V. (1999). Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. *Braz J Med Biol Res.* 32:207-14.
- Otani M, Yoshida M, Iwashita H, Kawano Y, Miyamae K, Inadome A, Nishi T, Ueda S. (2004) Electroporation-mediated muscarinic M3 receptor gene transfer into rat urinary bladder. *Int J Urol.* 11:1001-8.
- Pack GT. (1962). The pigmented mole and the malignant melanoma. *CA Cancer J Clin.* 12:11-26.
- Pan CC, Hayman JA. (2004). Recent advances in radiation oncology. *J Neuroophthalmol.* 24(3):251-7.
- Pérez-Vallés A, Martorell-Cebollada M, Nogueira-Vázquez E, García-García JA, Fuster-Diana E. (2001). The usefulness of antibodies to the BRCA1 protein in detecting the mutated BRCA1 gene. An immunohistochemical study. *J Clin Pathol.* 54(6):476-80.
- Perreault C, Brochu S. (2002). Adoptive cancer immunotherapy: discovering the best targets. *J Mol Med.* 80(4):212-8.
- Pisetsky DS. (2001). Immune response to DNA in systemic lupus erythematosus. *Isr Med Assoc J.* 3:850-853.
- Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C. (2003). Can different genetic changes characterize histogenetic subtypes and biologic behavior in sporadic malignant melanoma of the skin? *Cell Mol Life Sci.* 60(9):1923-32.
- Powers W E. (1976). Goals for the future of radiation oncology. *CA Cancer J Clin.* 26(5):310-4.
- Prud'homme GJ. (2005). DNA vaccination against tumors. *J. Gene. Med.* 7(1):3-17.
- Puttikhunt C, Kasinrerk W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, Moonsom S, Sittisombut N, Malasit P. (2003). Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods.* 109(1):55-61.

- Quick D. (1954). The influence of radium on cancer therapy. *Can Med Assoc J.* 71(2):103-9.
- Rees RC, Mian S. (1999). Selective MHC expression in tumours modulates adaptive and innate antitumour responses. *Cancer Immunol Immunother.* 48(7):374-81.
- Reifler RM. (1986). Radiation sequelae. *CA Cancer J Clin.* 36(3):191-2.
- Ren R, Racaniello VR. (1992) Human poliovirus receptor gene expression and poliovirus tissue tropism in transgenic mice. *J Virol.* 66(1):296-304.
- Risom L, Møller P, Loft S. (2005). Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res.* 592:119-37.
- Rols MP, Coulet D, Teissié J. (1992) Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system. *Eur J Biochem.* 206(1):115-21.
- Rols, MP, Delteil C, Golzio M, Dumond P, Cros S, Teissie J. (1998) In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol.* 16:168-71.
- Rols MP, Teissié J. (1990) Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys J.* 58(5):1089-98.
- Salk<sub>a</sub> JE, Lewis LJ, Bennett BL, Ward EN, Krech U, Younger JS, Bazeley PL. (1955). Antigenic activity of poliomyelitis vaccines undergoing field test. *Am J Public Health Nations Health.* 45(2):151-62.
- Salk<sub>b</sub> JE. (1955). Vaccination against paralytic poliomyelitis performance and prospects. *Am J Public Health Nations Health.* 45(5 Pt 1):575-96.
- Scott RB. (1970). Cancer chemotherapy--the first twenty-five years. *Br Med J.* 4:259-65.
- Shiver JW, Perry HC, Davies ME, Freed DC, Liu MA. (1995) Cytotoxic T lymphocyte and helper T cell responses following HIV polynucleotide vaccination. *Ann N Y Acad Sci.* 772:198-208.
- Silagi S. (1969). Control of pigment production in mouse melanoma cells in vitro. Evocation and maintenance. *J Cell Biol.* 43(2):263-74.
- Skipper H E. (1964) Perspectives in cancer chemotherapy: therapeutic design. *Cancer Res.* 24:1295-302.



- Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka, LY, Balch CM, Mihm MC. (2001). Malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 125(10):1295-306.
- Soiffer R, Lynch T, Mihm M, Jung K, Rhuda C, Schmollinger JC, Hodi FS, Liebster L, Lam P, Mentzer S, Singer S, Tanabe KK, Cosimi AB, Duda R, Sober A, Bhan A, Daley J, Neuberg D, Parry G, Rokovich J, Richards L, Drayer J, Berns A, Clift S, Cohen LK, Mulligan RC, Dranoff G. (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(22):13141-6.
- Solecki D, Gromeier M, Harber J, Bernhardt G, Wimmer E. (1998) Poliovirus and its cellular receptor: a molecular genetic dissection of a virus/receptor affinity interaction. *J Mol Recognit.* 11(1-6):2-9.
- Soler MN, Bobé P, Benihoud K, Lemaire G, Roos BA, Lausson S. (2000) Gene therapy of rat medullary thyroid cancer by naked nitric oxide synthase II DNA injection. *J Gene Med.* 2:344-52.
- Sun XY, Wu ZD, Hu JB. (2002). Suicide gene therapy of hepatocellular carcinoma and delivery procedure and route of therapeutic gene in vivo. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 1:373-7.
- Sutter RW, Suleiman AJ, Malankar P, Al-Khusaiby S, Mehta F, Clements GB, Pallansch MA, Robertson SE. (2000). Trial of a supplemental dose of four poliovirus vaccines. *N Engl J Med.* 343:767-73.
- Tachibana R, Harashima H, Shinohara Y, Kiwada H. (2001). Quantitative studies on the nuclear transport of plasmid DNA and gene expression employing nonviral vectors. *Adv Drug Deliv Rev.* 52:219-26.
- Tachibana K, Uchida T, Ogawa K, Yamashita N, Tamura K. (1999) Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. *Lancet.* 353(9162):1409.
- Tait BD. (2000). HLA class I expression on human cancer cells. Implications for effective immunotherapy. *Hum Immunol.* 61(2):158-65.
- Takeichi N, Austin FC, Oikawa T, Boone CW. (1978) Augmented immunogenicity of tumor cell membranes produced by infection with influenza virus as compared to Moloney sarcoma virus. *Cancer Res.* 38(12):4580-4.

- Tamura T, Nishi T, Goto T, Takeshima H, Ushio Y, Sakata T. (2003). Combination of IL-12 and IL-18 of electro-gene therapy synergistically inhibits tumor growth. *Anti Cancer Res.* 23:1173-9.
- Tanelian DL, Barry MA, Johnston SA, Le T, Smith G. (1997) Controlled gene gun delivery and expression of DNA within the cornea. *Biotechniques.* 23:484-8.
- Tang DC, De Vit M, Johnston SA. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356:152-4.
- Tanigawa K, Yu H, Sun R, Nickoloff BJ, Chang AE. (2000) Gene gun application in the generation of effector T cells for adoptive immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 48:635-43.
- Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, Namba T, Yamasaki K, Hashiya N, Aoki M, Ogihara T, Yasufumi K, Morishita R. (2002) Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation.* 105:1233-9.
- Tarhini AA, Kirkwood JM, Tawbi H, Gooding WE, Islam MF, Agarwala SS. (2008). Safety and efficacy of arsenic trioxide for patients with advanced metastatic melanoma. *Cancer.* 112:1131-8.
- Tauceri F, Mura G, Roseano M, Framarini M, Ridolfi L, Verdecchia GM. (2008). Surgery and adjuvant therapies in the treatment of stage IV melanoma: our experience in 84 patients. *Langenbecks Arch Surg.* [Epub ahead of print]
- Tejeda HA, Green SB, Trimble EL, Ford L, High JL, Ungerleider RS, Friedman MA, Brawley OW. (1996). Representation of African-Americans, Hispanics, and whites in National Cancer Institute cancer treatment trials. *J Natl Cancer Inst.* 88(12):812-6.
- Teissie J, Tsong TY. (1981) Electric field induced transient pores in phospholipid bilayer vesicles. *Biochemistry.* 20:1548-54.
- Teupe C, Richter S, Fisslthaler B, Randriamboavonjy V, Ihling C, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. (2002). Vascular gene transfer of phosphomimetic endothelial nitric oxide synthase (S1177D) using ultrasound-enhanced destruction of plasmad-loaded microbubbles improves vasoreactivity. *Circulation.* 105:1104-9.

- Tobiasch E, Kehm R, Bahr U, Tidona CA, Jakob NJ, Handermann M, Darai G, Giese M. (2001) Large envelope glycoprotein and nucleocapsid protein of equine arteritis virus (EAV) induce an immune response in Balb/c mice by DNA vaccination; strategy for developing a DNA-vaccine against EAV-infection. *Virus Genes*. 22:187-99.
- Tomita N, Higaki J, Morishita R, Kato K, Mikami H, Kaneda Y, Ogihara T. (1992). Direct in vivo gene introduction into rat kidney. *Biochem Biophys Res Commun*. 186:129-34.
- Touloukian CE, Leitner WW, Robbins PF, Li YF, Kang X, Lapointe R, Hwu P, Rosenberg SA, Restifo NP. (2002). Expression of a "self-"antigen by human tumor cells enhances tumor antigen-specific CD4 (+) T-cell function. *Cancer Res*. 62(18):5144-7.
- Tran PL, Vigneron JP, Pericat D, Dubois S, Cazals D, Hervy M, DeClerck YA, Degott C, Auclair C. (2003). Gene therapy for hepatocellular carcinoma using non-viral vectors composed of bis guanidinium-tren-cholesterol and plasmids encoding the tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-2 and TIMP-3. *Cancer Gene Ther*. 10:435-44.
- Tysnes BB, Bjerkvig R. (2007). Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 1775:283-97.
- Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, Tilgen W, Grosse-Wilde H, Reinhold U. (2001). Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy. *Cancer*. 92(2):369-76.
- US Food and Drug Administration: Guidance for Industry #52. Assessment of the effects of antimicrobial drug residues from food of animal origin on the human intestinal flora. (2004).
- Walther W, Minow T, Martin R, Fichtner I, Schlag PM, Stein U. (2006). Uptake, biodistribution, and time course of naked plasmid DNA trafficking after intratumoral in vivo jet injection. *Hum Gene Ther*. 17:611-24.
- Walther W, Stein U, Fichtner I, Kobelt D, Aumann J, Arlt F, Schlag PM. (2005). Nonviral jet-injection gene transfer for efficient in vivo cytosine deaminase suicide gene therapy of colon carcinoma. *Mol Ther*. 12:1176-84.

- Wasan EK, Reimer DL, Bally MB. (1996). Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-induced damage when complexed to cationic liposomes. *J Pharm Sci.* 85:427-33.
- Wei WZ, Ratner S, Shibuya T, Yoo G, Jani A. (2001) Foreign antigenic peptides delivered to the tumor as targets of cytotoxic T cells. *J Immunol Methods.* 258:141-50.
- Weiner DB, Kennedy RC. (1999) Genetic vaccines. *Sci Am.* 281(1):50-7.
- White, D. O., Fenner, F. J. (1994). *Medical Virology. Cuarta Edición.* Inc, Academic Press. San Diego, California. 382- 439 pp.
- White WI, Wilson SD, Palmer-Hill FJ, Woods RM, Ghim SJ, Hewitt LA, Goldman DM, Burke ST, Jenson AB, Koenig S, Suzich JA. (1999). Characterization of major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1. *J. Virol.* 73(6):4882-4889.
- Williams RS, Johnston SA, Riedy M, DeVit MJ, McElligott SG, Sanford JC. (1991) Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(7):2726-30.
- Wilson, J. (1991). *Principios de Medicina Interna.* 12a Edición. Nueva Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. México, D., F. 558-565, 786-794.
- Wimmer E and Nomoto A. (1993). Molecular biology and cell-free synthesis of poliovirus. *Biologicals.* 21: 349-356.
- Wise KS. (1977) Vesicular stomatitis virus-infected L1210 murine leukemia cells: increased immunogenicity and altered surface antigens. *J Natl Cancer Inst.* 58(1):83-90.
- Wolf H, Rols MP, Boldt E, Neumann E, Teissié J. (1994) Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys J.* 66:524-31.
- Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB, Kilbourn A, Spielman A, Lal AA (1998) Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? *Emerg. Infect. Dis.* 4: 149-158.
- Xue SA, Stauss HJ. (2007). Enhancing immune responses for cancer therapy. *Cell Mol Immunol.* 4:173-84.
- Yang NS, Hogge GS, MacEwen EG. (1999) Particle-mediated gene delivery: applications to canine and other larger animals systems. In: *Nonviral vector*

for Gene Therapy, Huang L, Hung MC, Wagner E. Academic Press, San Diego, pp 171-90.

- Yang ZM, Li EM, Lai BC, Wang YL, Si LS. (2007) Anti-CD3 scFv-B7.1 fusion protein expressed on the surface of HeLa cells provokes potent T-lymphocyte activation and cytotoxicity. *Biochem Cell Biol.* 85:196-202.
- Zhang J, Frolov I, Russell SJ. (2004). Gene therapy for malignant glioma using Sindbis vectors expressing a fusogenic membrane glycoprotein. *J Gene Med.* 6:1082-91.
- Zhang L, Li L, Hoffmann GA, Hoffman RM. (1996) Depth-targeted efficient gene delivery and expression in the skin by pulsed electric fields: an approach to gene therapy of skin aging and other diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 220(3):633-6.
- Zhang L, Nolan E, Kreitschitz S, Rabussay DP. (2002) Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation. *Biochim Biophys Acta.* 1572(1):1-9.