

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCION DE POSTGRADO

89



**“EXPRESION DE LA ONCOPROTEINA E7 DEL  
PAPILOMAVIRUS HUMANO HPV-16 SOBRE LA  
SUPERFICIE DE *Lactococcus lactis*, Y EVALUACION  
DE SU POTENCIAL INMUNOGENICO”**

**PRESENTA  
QBP NAIMA GISELA CORTES PEREZ**

**COMO REQUISITO PARA  
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

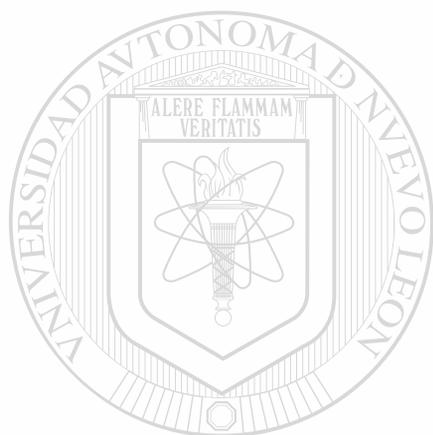
**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.  
DICIEMBRE 2001**

TM  
RC280  
.U8  
C6  
c.1

2001



1080117247



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

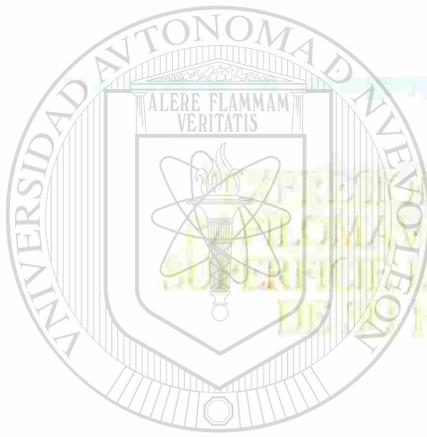


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DEL POSTGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ALBERCA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

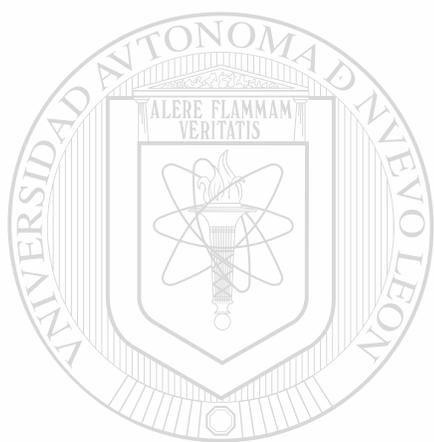
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONDO REQUISITO PARA  
OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.,  
DICIEMBRE 2001



IM  
C280  
U8  
C6



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

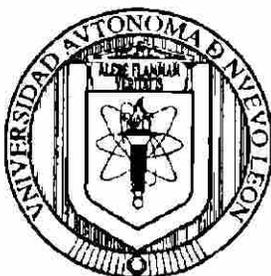
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



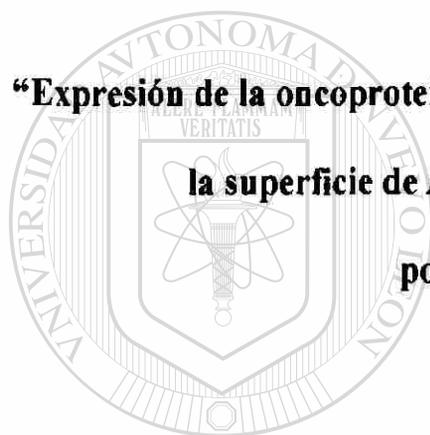
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCION DE POSTGRADO



**“Expresión de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano HPV-16 sobre  
la superficie de *Lactococcus lactis*, y evaluación de su  
potencial inmunogénico”**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

COMISION DE TESIS

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dr. Juan Manuel Alcocer González

Presidente

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Secretario

Dra. Licet Villarreal Treviño

Vocal

Three handwritten signatures are written over horizontal lines. The first signature is above the line for the President, the second is above the line for the Secretary, and the third is above the line for the Vocal. The signatures are in black ink and appear to be cursive.

## AREA DE TRABAJO

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Alcocer González, el Dr. Roberto Montes de Oca Luna, y la Co-Dirección del Dr. Reyes Tamez Guerra.



### CREDITOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que me otorgó la beca de maestría.

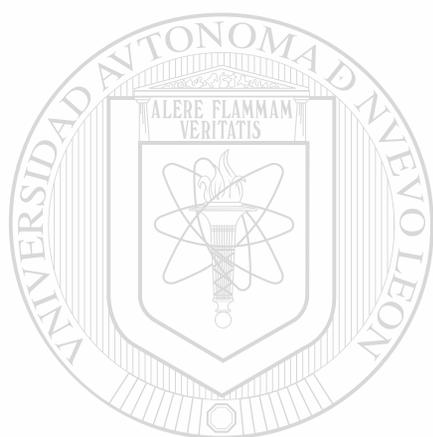
UANL

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) que me aceptó dentro de su programa de posgrado.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Al PAICYT que apoyo este trabajo con el proyecto CN 176-99 a cargo del Dr. Reyes Tamez Guerra.



*A mi familia y muy especialmente*

*a esas dos pequeñas personitas de mi vida.*

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por llenar de bendiciones mi vida

Agradezco a mis padres Ignacio y Josefina por brindarme su apoyo en todo momento

Agradezco a mis hermanos por impulsarme a seguir adelante

Agradezco al Dr. Juan Manuel Alcocer por su asesoría en la elaboración de este trabajo.

Agradezco al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por su tiempo y acertada asesoría

Dra Diana, al MC. Claudio y al QBP Ricardo por su ayuda con el microscopio confocal

Agradezco al Biol. Luis G Bermúdez Humarán por su paciencia, por brindarme su apoyo, su cariño y su confianza, gracias calabacita;

Quiero agradecer también a todos mis amigos y compañeros del laboratorio de Inmunología por hacer del lugar de trabajo un sitio agradable y reconfortante, gracias, Analy, Areli, Araceli, Arnulfo, Jorge, Luis, Humberto, Deyanira, Gil, Julian, Víctor, Claudio, Ricardo, Jenny, Sigifredo, Angel, Marco, Letty, Diana, Moisés, Marta, Herminio, Irma,

A mis amigos Gera, Narce, Marco, Fer, Omar, Claudia, Karla, Saul, Karina, Moron, Tete y Rosy gracias por su apoyo y compañía.

Gracias a todos los que de alguno u otra manera colaboraron conmigo para la realización de este trabajo.

¡GRACIAS!

## INDICE GENERAL

Portada.....	1
Comisión de tesis.....	2
Area de trabajo .....	3
Créditos .....	3
Dedicatoria .....	4
Agradecimientos .....	5
Indice general .....	6
Indice de figuras .....	9
Indice de tablas .....	10
Abreviaturas .....	11
Resumen .....	13
Introducción .....	14
Antecedentes .....	16
Papilomavirus .....	16
Estructura viral .....	16
Infección y patología .....	17
Papilomavirus y cáncer .....	18
Oncoproteínas E6 y E7 .....	19
Respuesta Inmune .....	22
Respuesta Inmune Humoral .....	22
Respuesta Inmune Celular .....	23
Evasión viral .....	24
Vacunas .....	25
Vacunas contra HPV .....	25
Estrategias .....	28
Sistemas para la inmunización mucosal .....	31
Bacterias como vehiculos .....	32
<i>Lactococcus lactis</i> como modelo .....	33
Importancia .....	38
Hipótesis .....	38
Objetivo general .....	39
Objetivos Especificos .....	39

Estrategia experimental .....	40
Material .....	41
Material Biológico .....	41
Enzimas .....	42
Kit's .....	42
Reactivos .....	42
Equipo .....	44
Metodología .....	45
Construcción de plásmidos recombinantes .....	45
Amplificación de E7 .....	45
Clonación bajo promotor $P_{msA}$ .....	46
Transformación .....	47
<i>Escherichia coli</i> .....	47
Preparación de células calcio-competentes .....	47
Transformación .....	48
Selección de clonas .....	48
<i>Lactococcus lactis</i> .....	48
Preparación de células electro-competentes .....	48
Electrotransformación .....	49
Selección de clonas .....	49
Extracción de DNA plasmídico .....	50
Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala .....	50
<i>Escherichia coli</i> .....	50
<i>Lactococcus lactis</i> .....	50
Aislamiento de DNA plasmídico a mediana escala .....	51
Determinación de la expresión de E7 .....	51
Preparación de extractos .....	51
SDS-PAGE .....	53
Transferencia .....	53
Western Blot .....	54
Inmunofluorescencia .....	54
Determinación de la concentración de E7 .....	55
Evaluación de la respuesta inmune humoral .....	55
Preparación de células.....	55

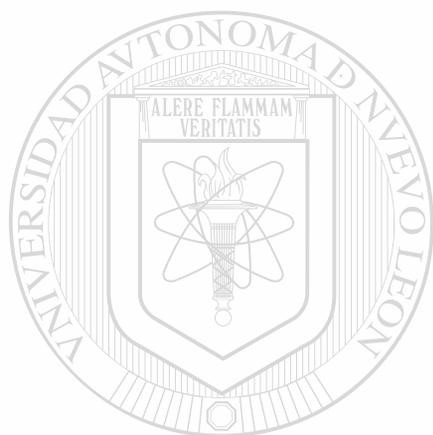
Inmunización .....	56
Obtención de Suero .....	56
Western Blot .....	56
Evaluación de citocinas relacionadas con la respuesta inmune celular ..	57
Obtención de células de bazo .....	57
Cultivo de células .....	57
ELISA .....	57
Resultados .....	58
Oligonucleótidos diseñados .....	60
Amplificación del gen E7 .....	60
Clonación en pGEMT .....	60
Construcción de un vector recombinante para la expresión de E7 en superficie .....	62
<i>Lactococcus lactis</i> es capaz de expresar la proteína E7 .....	65
Cuantificación de la producción de E7 por <i>Lactococcus lactis</i> .....	66
Expresión de la proteína E7 en la superficie de <i>Lactococcus lactis</i> ..	67
La bacteria recombinante construida es capaz de inducir la producción de anticuerpos .....	69
La administración nasal de la bacteria recombinante induce la producción de INF- $\gamma$ .....	70
Discusión .....	71
Conclusiones .....	73
Anexo .....	74
Literatura citada .....	81

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Virus del papiloma humano .....	16
Figura 2. Organización génica del HPV .....	17
Figura 3. Infección por HPV y desarrollo del cáncer .....	20
Figura 4. Interacción de E7 con Rb .....	21
Figura 5. Presentación de antígenos a LTA .....	23
Figura 6. Presentación de antígenos a .....	24
Figura 7. Representación del tráfico celular del sistema inmune mucosal .....	34
Figura 8. Hexapéptido conservado en las proteínas de superficie de bacterias	
Gram-positivas .....	36
Figura 9. Mecanismo de anclaje en bacterias Gram-positivas .....	37
Figura 10. Amplificación del gen E7 .....	60
Figura 11. Mapa del vector pGEM-T utilizado para clonar el producto de	
PCR de E7 .....	61
Figura 12. Caracterización de clonas recombinantes pGEMT-E7 .....	61
Figura 13. Mapa del vector de expresión pVE5547 .....	62
Figura 14. Caracterización de los plásmidos usados .....	63
Figura 15. Sistema para la expresión inducible de E7 .....	63
Figura 16. Caracterización del vector recombinante pVE3684-E7 .....	64
Figura 17. Mapa del vector recombinante para la expresión de E7 en superficie de	
<i>Lactococcus lactis</i> .....	64
Figura 18. Producción de E7 en <i>Lactococcus lactis</i> .....	65
Figura 19. Cuantificación de E7 mediante Western blot .....	66
Figura 20. Detección de E7 en la superficie de <i>Lactococcus lactis</i> por	
Inmunofluorescencia .....	67
Figura 21. Detección de anticuerpos anti-E7 por Western Blot en suero de ratones	
inmunizados con <i>Lactococcus lactis</i> expresando E7 en su superficie .....	68
Figura 22. Detección de anticuerpos anti-E7 por Western Blot en suero de ratones	
inmunizados con <i>Lactococcus lactis</i> expresando E7 en su superficie .....	69
Figura 23. Inducción de IL-2 por <i>Lactococcus lactis</i> expresando E7 en su superficie....	70
Figura 24. Inducción de INF- $\gamma$ por <i>Lactococcus lactis</i> expresando E7 en su superficie ..	70

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de las proteínas virales .....	17
Tabla 2. Vacunas profilácticas en desarrollo.....	27
Tabla 3. Vacunas terapéuticas en desarrollo.....	28
Tabla 4. Estrategias para la elaboración de vacunas.....	31
Tabla 5. Antígenos expresados en <i>Lactococcus lactis</i> .....	35
Tabla 6. Representación de la secuencia de los genes E7, M6 y Usp45 .....	58



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

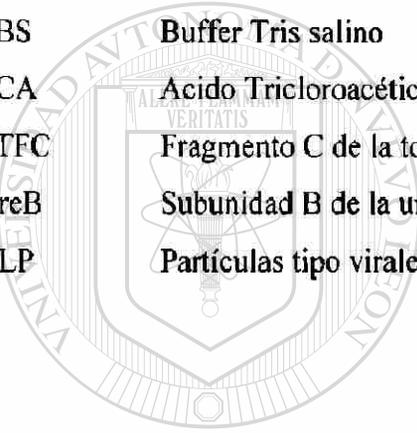


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de Calmette-Gueérin
BSA	Albumina de Suero Bovina
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
CPS	Polisacarido capsular
CWA	Anclaje a pared celular
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT-LB	Buffer de carga para proteínas
GRAS	Generalmente Seguro
GST	Glutación-S-Transferasa
HPV	Virus del Papiloma Humano
hrs	Horas
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
kDa	Kilo Daltones
Kb	Kilo bases
LAMP	Proteina lisosomal asociada a membrana
LB	Luria-Bertani
LCR	Región de Control
LT	Linfocito T
LTA	Linfocito T ayudador
LTC	Linfocito T citotóxico
MHC	Complejo mayor de Histocompatibilidad
min	Minutos
ml	Mililitro
μl	Microlitro
MVA	Virus vaccinia Ankara modificado
NIC	Neoplasia Intraepitelial cervical
NK	Asesinas naturales
nm	nanómetro
NSP4	Proteína 4 no estructural
NucA	Nucleasa A

ORF	Marco de lectura abierta
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
$P_{nrsA}$	Promotor nisina
PSA	Persulfato de amonio
Rb	Retinoblastoma
RE	Retículo Endoplásmico
S4	Subunidad 4
SDS	Lauril Sulfato
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia
TAP	Proteínas asociadas a la presentación de antígeno
TBS	Buffer Tris salino
TCA	Ácido Tricloroacético
TTFC	Fragmento C de la toxina del tétanos
UreB	Subunidad B de la ureasa
VLP	Partículas tipo virales



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

Debido a la gran necesidad de combatir la proliferación de enfermedades mediante vacunas, han surgido diversas estrategias para su desarrollo, muchas de las cuales no resultan muy confiables o no son recomendables en pacientes inmunosuprimidos o en infantes, por esta razón y para evitar complicaciones se ha pensado en utilizar bacterias ácido lácticas recombinantes capaces de servir como vehículos transportadores de antígenos en el organismo. *Lactococcus lactis* es un organismo grado-alimenticio el cual es ampliamente usado en la elaboración de productos lácteos y más recientemente como vector para expresar proteínas heterólogas de interés médico. En este trabajo se hizo uso de la ingeniería genética para diseñar un modelo de expresión de la proteína E7 del HPV-16, sobre la superficie de *Lactococcus lactis*. Además esta bacteria recombinante fue capaz de despertar una respuesta inmune humoral de tipo IgG y de inducir la producción de INF- $\gamma$  en células de bazo cuando fue administrada nasalmente en un modelo murino. Estos resultados muestran el gran potencial de este sistema como modelo de vacuna mucosal contra HPV y otras neoplasias relacionadas.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

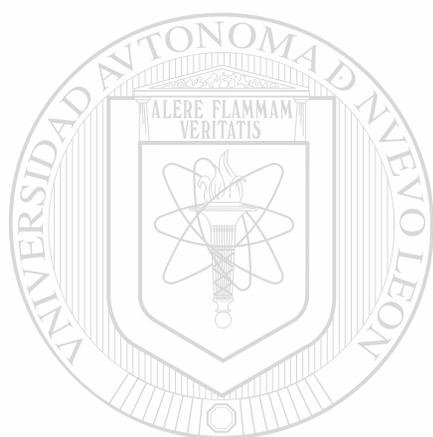
## INTRODUCCION

La idea de manipular bacterias para la presentación de antígenos heterólogos, no es nueva, pero está acentuada en la atenuación de organismos patógenos como son *Salmonella sp.* y *Mycobacterium sp.*, ya que se basan en el hecho de que son organismos invasivos, sin embargo esta característica puede ser un factor limitante en ciertos grupos vulnerables, como niños y pacientes inmunosuprimidos. Debido a lo anterior, el uso de bacterias probióticas recombinantes para la presentación de antígenos de interés médico es un área que va en constante aumento; ya que éstos modelos ofrecen múltiples ventajas principalmente en seguridad. Este trabajo se enfoca en el uso de la bacteria ácido láctica grado-alimenticio *Lactococcus lactis* comúnmente conocida como organismo GRAS (generally regarded as safe) para la expresión de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano tipo 16 (HPV-16).

El papilomavirus humano (HPV) es el agente causal de las verrugas que crecen en manos, pies y también aquellas que crecen en boca y área genital. La infección genital por este agente es considerada como la enfermedad viral de transmisión sexual más común, pero lo más importante es que algunos tipos de HPV's han sido involucrados en el desarrollo del cáncer, principalmente con el cáncer cervicouterino (CaCu); incluso se cree que el factor de riesgo más influyente para el desarrollo del CaCu es la infección con algún tipo de los HPV's juzgados como de alto riesgo. El CaCu representa un problema de salud para la humanidad [1-3], ya que es el cáncer más común después del de mama [1], sin embargo en México el CaCu ha sido en la última década el cáncer más frecuente entre la población femenina [3]. Debido a esto es de gran importancia obtener medidas eficaces para la prevención, diagnóstico oportuno y terapia contra el HPV y el CaCu.

Actualmente se realizan estudios encaminados a combatir este patógeno mediante vacunas, que igualmente podrían ser de utilidad para el control terapéutico del CaCu. Se han elaborado

diversas estrategias, entre las cuales está el uso de partículas tipo virus (VLP's), DNA desnudo, entre otras, con este trabajo pretendemos ampliar las perspectivas en el tratamiento del CaCu al proponer un nuevo y seguro modelo de expresión de la proteína E7, que permita inducir inmunidad de tipo celular y humoral.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



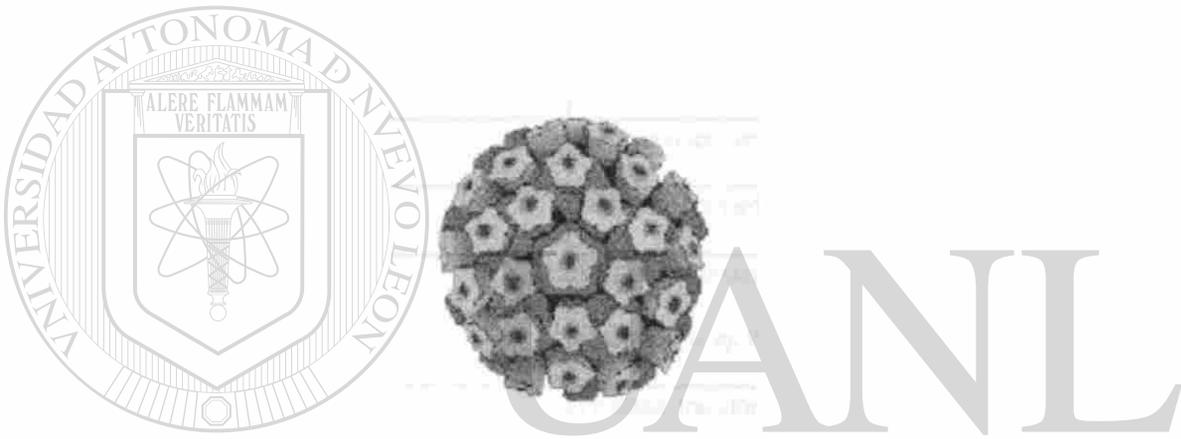
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ANTECEDENTES

### I. PAPILOMAVIRUS

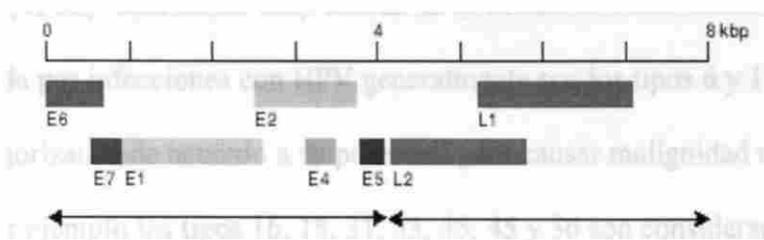
### II. ESTRUCTURA VIRAL

La familia de los papilomavirus constituye un grupo muy heterogéneo de virus, hasta 1996 se distinguen 77 genotipos diferentes que han sido identificados en humanos y 30 secuencias parciales que aún están sin comprobar [4]. El diámetro de la partícula de HPV es aproximadamente de 55 nm (Figura 1). Contiene un genoma de DNA de doble cadena, el cual está asociado con proteínas parecidas a histonas y está encapsidado por 72 capsómeros [4].



**Figura 1. Virus del papiloma humano (HPV)**

El genoma consta de 7200-8000 pb de DNA de doble cadena [4], y contiene 8 marcos de lectura abierta (ORF) y una región no codificante [35]. Puede ser dividido dentro de tres regiones (Figura.2): (a) Región de control (LCR) la cual cubre aproximadamente el 10% del genoma, (b) Región temprana (E -early) y (c) Región tardía (L – late) [53]. Los genes L codifican para las proteínas de la cápside [3], la región temprana mantiene las funciones regulatorias, replicación del DNA y activación del ciclo celular [4]. La proteína E1 esta relacionada con la replicación, E2 con la transcripción y E6 y E7 con la transformación celular Tabla 1 [3].



**Figura 2. Organización génica del HPV**

**Tabla 1. Funciones relacionadas con las proteínas virales**

GENE	FUNCION RELACIONADA
E1	Inicio de la replicación del DNA (helicasa)
E2	Regulación transcripcional, Replicación del DNA
E3	No se conoce con exactitud
E4	Proteínas NS tardías, Disturbios del citoesqueleto?
E5	Proteína transformante Interacciona con factores de crecimiento, ej. PDGF
E6	Proteína transformante, se une a p53 dirigiendo su degradación
E7	Proteína transformante se une a Rb
E8	No se conoce con exactitud
L1	Proteína mayor de la cápside
L2	Proteína menor de la cápside

## I.2. INFECCION Y PATOLOGIA

La infección por HPV es la enfermedad de transmisión sexual más común [6, 10], con una prevalencia del 10%–50% en la mujer sexualmente activa [10]. Las infecciones en humanos provocan una gran variedad de proliferaciones: verrugas, quistes epiteliales, neoplasia intraepitelial, anogenital y papiloma faringeal, queratocantomas y otros tipos de lesiones

hiperqueratosas [4, 10]. Una lesión muy común es la conocida como condilomata acuminata la cual es causada por infecciones con HPV generalmente por los tipos 6 y 11 [7]. Los HPV's pueden ser categorizados de acuerdo a su potencial para causar malignidad en HPV's de bajo y alto riesgo, por ejemplo los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45 y 56 son considerados de alto riesgo para lesiones anogenitales malignas [10].

En las mujeres infectadas con HPV's de los considerados de alto riesgo generalmente son detectadas lesiones cervicales benignas y progenitores del carcinoma cervical así como casos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) [20].

### 1.3. PAPILOMAVIRUS Y CANCER

Varios tipos de HPV han sido aislados de tumores malignos [5], específicamente de cáncer de cérvix y otros cánceres anogenitales, pero también cáncer de piel, cavidad oral y nasal han sido asociado con infecciones por HPV [5, 6]. Además los tipos 5 y 8 han sido ligados al cáncer de piel en pacientes con raras enfermedades como epidermodisplasia verruciformis

[10]. Se conoce que alrededor del 90% de los cánceres de cérvix pueden atribuirse a ciertos tipos de HPV [1, 4, 20], ya que se ha podido detectar la presencia de HPV's de alto riesgo, y algunos investigadores proponen que la infección por este tipo de agentes sea la causa directa del cáncer cervical [10]. Sin embargo la presencia y expresión de virus aparentemente es insuficiente para la carcinogénesis [1, 21], se considera que factores ambientales o genéticos, tales como el cigarrillo y la predisposición genética están ligados a carcinogénesis cervical asociada a HPV's de alto riesgo [21], además la exposición a estrógenos (por ejemplo en anticonceptivos orales) duplica el riesgo de neoplasia y malignidad por HPV [21]. También están considerados como cofactores los antígenos de histocompatibilidad, la respuesta inmunológica, la influencia de las hormonas y otros agentes de transmisión sexual como

*Chlamydia trachomatis* [1], aunque ciertas investigaciones realizadas sobre líneas celulares de epitelio oral sugieren que el HPV por si solo puede inducir la transformación si permanece activo [18].

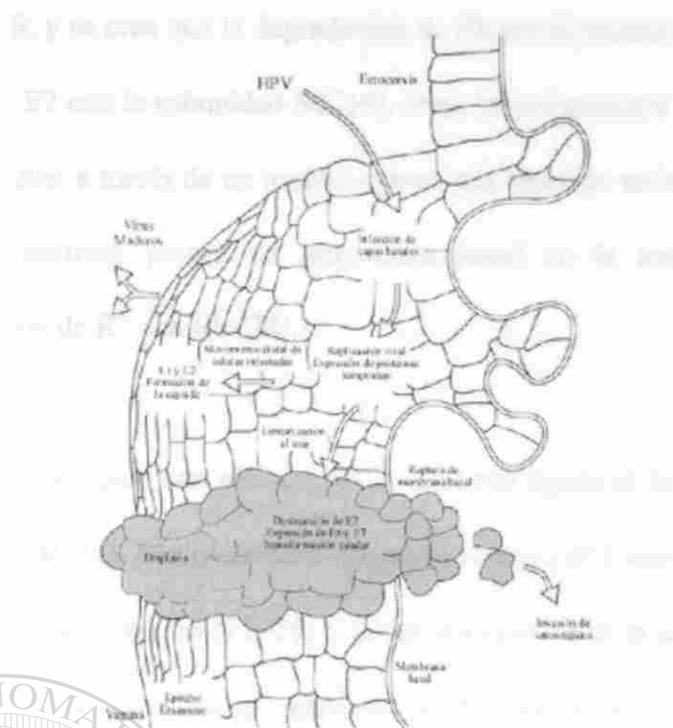
Los HPV's más reconocidos por su malignidad son el tipo 16 y el 18 [9], ya que se han identificados como el agente causal de al menos el 90% de los cánceres de cérvix [4] y se encuentran ligados al 50% de los otros cánceres anogenitales, es por ello que son considerados de alto riesgo [4], de ellos el HPV-16 representa la mayor proporción (50%), seguido por HPV-18, además los HPV-45 (8%), y HPV-31 (5%) [1].

Ciertas observaciones indican que en la infección inicial el HPV está presente de forma episomal, pero en la mayoría de las lesiones avanzadas y tumores invasivos el HPV está integrado al genoma del hospedero [35], por lo tanto la integración del DNA del HPV al genoma está correlacionada con el incremento en la expresión de genes virales y el avance del desarrollo celular (Figura 3) [79], otras observaciones corroboran la hipótesis de que la integración provee un selectivo incremento de los precursores de carcinoma de epitelio cervical [20].

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### I.4. ONCOPROTEINAS :

Actualmente se sabe que los genes virales E6 y E7 de los HPV's de alto riesgo (tipo 16 y 18) actúan como oncogenes [5], y son comúnmente expresadas en células de cáncer cervical [13, 14, 17, 20]. Incluso se ha demostrado que la principal función transformante de HPV-18 está localizada en los productos de los genes E6 y E7 [24].

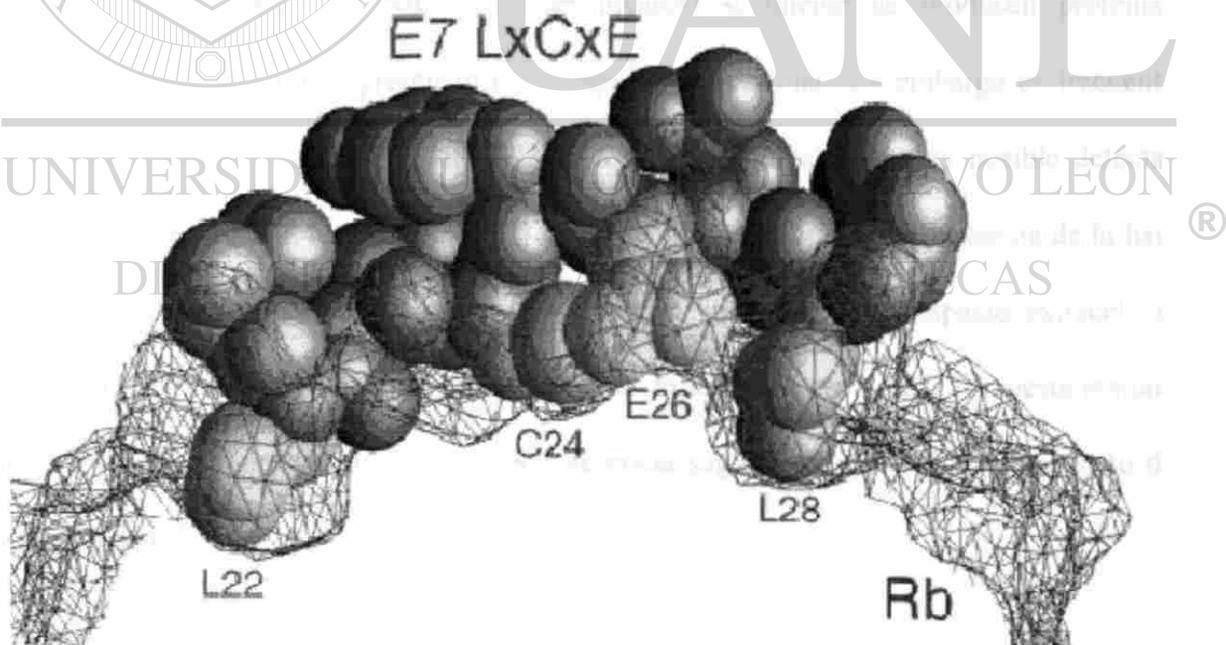


**Figura 3. Infección por HPV y desarrollo de cáncer**

El gen de la proteína E7 del HPV-16 codifica para una fosfoproteína nuclear multifuncional de 98 aminoácidos que presenta similitud estructural y funcional con los antígenos E1A de adenovirus y T de papovavirus [15]. E7 ha sido localizada en la fracción soluble del citoplasma y posee una vida media de 1 hora [23], esta proteína coopera con el oncogen ras, además puede cooperar con E6 para lograr la eficiente inmortalización de queratinocitos humanos primarios [15], E7 purificada se une ávida y específicamente a la proteína retinoblastoma (Rb) (Figura 4) y puede disociar el factor de transcripción E2F *in vitro* [14, 15]. Se cree que la interacción de E7 con Rb sea un paso para la carcinogénesis [26, 29] ya que ésta inhibe la unión de Rb con el DNA, al igual que su unión con proteínas celulares y ciertas proteínas virales transformantes (E1A, T) y aparentemente bloquea la acción supresora de Rb [27]. Asimismo E7 es capaz de aumentar la actividad ATPasa de la subunidad 4 (S4)

del proteosoma 26 S, y se cree que la degradación de Rb por el proteosoma 26 S sea a través de la interacción de E7 con la subunidad S4 [19], otras investigaciones demuestran que la E7 del HPV-18 une al zinc a través de un motivo cys-xx-cys repetido en la región C terminal de la proteína, éstos motivos juegan un importante papel en la transformación pero no contribuyen a la unión de E7 con Rb [28].

El HPV codifica también para una proteína E6 la cual está ligada al desarrollo del cáncer [4, 5, 8, 13, 14, 16, 17, 20, 24], ésta proteína es capaz de unirse a p53 que es un gen supresor de tumor, induciendo su degradación [11, 20] a través del camino de la ubiquitina [4]. E6 y E7 juntas desarrollan alteraciones en la expresión de la ciclina A, ciclina B y cdc-2, los incrementos en la expresión de éstos y la eliminación de p53 seguidas de la expresión de E6 y E7 pueden ser importantes contribuidores del desarrollo de células inmortalizadas [17].

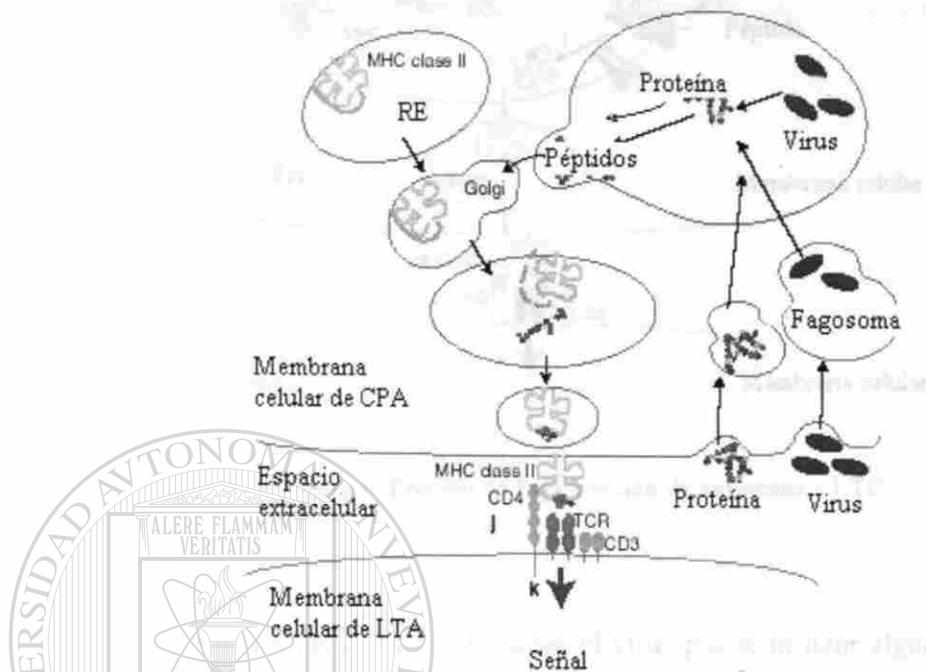


**Figura 4. Interacción de la proteína E7 con Rb.**

## I.5 RESPUESTA INMUNE

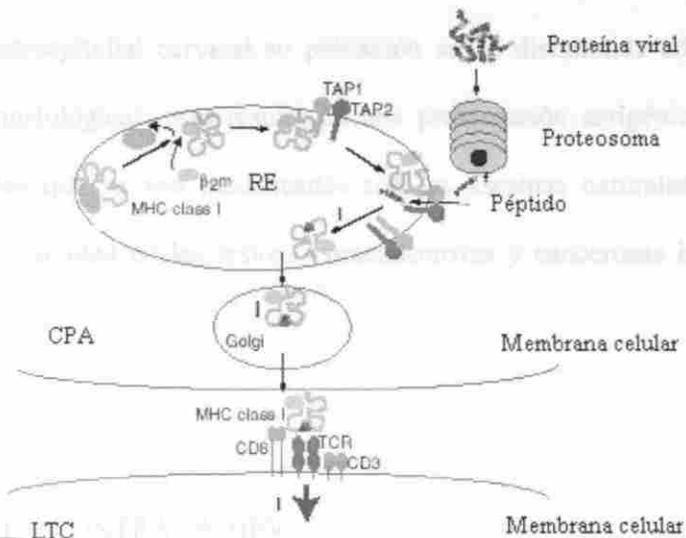
Existe importante evidencia que indica la estrecha relación entre el sistema inmune y la progresión de la enfermedad, por ejemplo se ha visto que las verrugas y las neoplasias asociadas a HPV tiene una mayor incidencia entre la población con depresión de la inmunidad celular, en pacientes receptores de transplantes, con terapia inmunosupresora, pacientes con SIDA o mujeres embarazadas [34, 52]

*I.5.1 Respuesta Inmune Humoral.* En las infecciones productivas este tipo de respuesta es muy importante, las partículas virales son atrapadas por linfocitos B con receptores de membrana específicos para algunos epítomos de las proteínas virales, internalizadas y digeridas para posteriormente ser presentadas unidas a las moléculas de MHC clase II, este complejo es reconocido por los linfocitos T ayudadores, los cuales estimulan a los linfocitos B para la producción de anticuerpos neutralizantes contra las partículas virales [34]. En las infecciones no productivas (NIC y cáncer invasor) solamente se producen proteínas tempranas, las cuales no se presentan en el espacio extracelular; sin embargo es frecuente encontrar anticuerpos contra E7 del HPV-16 o el 18, de igual forma es posible detectar anticuerpos contra E2, E4 y E6 [3, 34, 52] quizá debido a que como consecuencia de la lisis de las células cancerosas estos antígenos se pueden encontrar en el espacio extracelular (Figura 5) [53]. Hasta el momento no se conoce con exactitud el papel de la respuesta inmune humoral en los tumores invasores, pero su presencia sugiere el potencial inmunogénico de estas proteínas [34].



**Figura 5. Presentación de antígenos a LTA**

**1.5.2. Respuesta Inmune Celular.** La respuesta inmune mediada por células se encuentra dividida dentro de dos categorías, la mediada por linfocitos T citotóxicos (LTC) y la mediada por linfocitos T ayudadores (LTA). Para el reconocimiento de los HPV's por parte de los LTC es necesaria la expresión de los genes tempranos (E1-E7) dentro del citoplasma de la célula infectada. Esto genera péptidos que son capaces de unirse a las moléculas de MHC clase I (en humanos llamado antígeno leucocitario humano HLA). En los queratinocitos transformados por HPV la expresión constitutiva de las proteínas E6 y E7 podría derivar en la presentación de péptidos asociados a MHC clase I en la superficie del queratinocito (Figura 6) [53].



**Figura 6. Proceso de Presentación de antígenos a LTC**

**1.5.3 Evasión viral.** En las células infectadas el virus puede utilizar alguno de los siguientes caminos para evadir la respuesta inmune:

(1) La modulación de la expresión de las moléculas de MHC. Se ha visto que la expresión de las moléculas de MHC clase I o la beta-2 microglobulina se encuentra disminuida ligeramente

en los queratinocitos con condiloma, pero ausente en el 75% de los casos de carcinomas invasores; éste es un mecanismo de escape por medio del cual el virus evita ser reconocido por los LTC [34].

(2) La modulación de la secreción de citocinas celulares. Se han identificado la expresión de citocinas inmunosupresoras, tales como IL-10, IL-4 y TGF- $\beta$ , y la falta de expresión de citocinas con actividad antitumoral como IL-2 e IL-12, en biopsias de pacientes con cáncer cervicouterino avanzado, positivo al HPV-16 [3].

(3) Modulación de la acción de algunas células. En estudios realizados por inmunohistoquímica se logró observar que los tejidos de tumores cervicales tienen muy pocos linfocitos T con receptores para IL-2, lo cual indica que estos linfocitos no son activados

adecuadamente [3]. Las células de Langerhans también sufren alteraciones; en condilomas y en la neoplasia intraepitelial cervical su población se ve disminuida además de presentar modificaciones morfológicas, esto resulta en una presentación antigénica local ineficiente [34]. Otras células que se ven modificadas son las asesinas naturales (NK), las cuales presentan menor actividad en las lesiones precancerosas y cancerosas inducidas por HPV [34].

## II. VACUNAS

### II.2. VACUNAS EN CONTRA DE HPV

El papilomavirus y el CaCu representan un problema de gran impacto en la salud pública, por lo cual el desarrollo de vacunas es un factor esencial en su control. Para lograr diseñar una vacuna efectiva es muy importante considerar que se debe garantizar una adecuada respuesta inmune a través de cuatro metas: (1) activar los antígenos presentes en la célula, (2) superar la respuesta del huésped y la variabilidad genética viral, (3) generar altos niveles de células T y B de memoria y (4) persistencia de antígenos [33]. Además la habilidad de inducir respuesta inmune en el tracto reproductivo puede ser crítico para la eficacia de una vacuna [22], de tal manera que para inducir una respuesta inmune eficaz se requiere la activación simultánea de múltiples componentes del sistema inmune: por vía sistémica la estimulación de linfocitos T citotóxicos y cooperadores contra epítomos del virus del papiloma humano, y en un nivel local, la inducción de la secreción de citocinas, para aumentar el procesamiento y la presentación de blancos tumorales, así como la estimulación de los linfocitos, células asesinas naturales y macrófagos [34].

Se pueden diseñar dos clases de vacunas: las *profilácticas o preventivas*, las cuales pueden proteger al huésped contra la infección por el HPV y las *terapéuticas o curativas* las cuales

inducen regresión de las lesiones ya establecidas [34]. Las vacunas profilácticas contra HPV se basan en la inducción de IgA contra los antígenos de la cápside viral, (en la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de vacunas profiláctica en desarrollo).

Las vacunas terapéuticas se basan en la inducción de una respuesta inmunológica mediada por células específicas contra blancos virales, blancos celulares o ambos; la mayoría de los sistemas experimentales (Tabla 3) actuales están diseñados contra blancos virales, en especial contra E6 y E7 ya que no se conocen productos celulares que puedan servir como blancos para el desarrollo de vacunas [34]. También se ha considerado utilizar partículas virales conteniendo L1 sola o con L2 [10], sin embargo la utilización de partículas virales sintéticas y el uso de proteínas virales tempranas (E6 y E7) ha sido la pauta para realizar estudios que dirijan una respuesta inmune para prevenir la infección celular con resultados favorables [3]. La principal razón de esto es que los genes E6 y E7 son comúnmente expresados en células de carcinoma cervical [14] por eso han sido consideradas como base inmunológica en la terapia del cáncer cervical [10, 14], incluso se comportan como antígenos específicos de tumor por lo que representan el blanco para el diseño de vacunas para el control de HPV inductor de tumor [32]; además E7 y E2 son expresadas en lesiones epiteliales benignas y malignas por lo tanto son blancos potenciales de la regresión inmune mediada por células, lo cual no sucede con L1 y L2 [13].

**Tabla 2. Vacunas profilácticas en desarrollo**

Organización	Tipo de HPV y antígeno	Estrategia	Estado
Beecham SmithKline Medimmune, (MEDI-501)	HPV-11, L1	VLP	Fase II
Beecham SmithKline Medimmune, (MEDI-503 y 504)	HPV-16 y 18 L1	VLP	Fase I
Merk. CSL limited	HPV-16 L1	VLP	Fase II
Instituto Nacional de Cáncer NIAID	HPV-16 L1	VLP	Fase II
MediGene	HPV-16 L1,E7	VLP quimerico	Fase I II
Universidad de Queensland	HPV-16 L1,E7	VLP quimerico	Preclínico, respuesta inmune mucosal y sistema en ratones
CANSA, Universidad de Town Cape	HPV-16 L1,E7	BCG recombinante	Preclínico, respuesta inmune humoral y celular en el cerdo de guinea
Academia china de Medicina preventiva y Comunidad Europea	HPV-16 L1,E7	Virus vaccinia recombinante	Preclínico
Universidad de Queensland	HPV-16 L1,E7	BCG recombinante	Preclínico
Instituto Wistar	HPV-16 L1	Adenovirus recombinante	Preclínico, inmunización intranasal induce anticuerpos en suero y vagina
Wyeth-Lederle, Alpha Vax		Virus de la encefalitis equina venezolana recombinante	Preclínico, (también puede ser considerada como terapéutica)
Merck, Vical Inc.	L1	DNA	Preclínico, inducción de anticuerpos neutralizantes en conejos
Wyeth-Lederle		DNA	Preclínico
Instituto Wistar		DNA	Preclínico
CANSA, Universidad de Town Cape		Tomates comestibles	Preclínico

**Tabla 3. Vacunas Terapéuticas en desarrollo**

Organización	Tipo de HPV y antígeno	Estrategia	Estado
Cantab. SmithKline Beecham (TH-GW)	HPV-6 L2,E7	Péptido (proteínas de fusión)	Fase I/II
Cantab (TA-CIN)	HPV-16 18 L2,E6,E7	Péptido (proteínas de fusión)	Fase I
Instituto Nacional de Cáncer	HPV-16 E6,E7	Varios péptidos	Fase I/II
Instituto de Cáncer Norris, Universidad de Carolina del Sur	HPV-16 E7	Péptido	Fase I/II
StreetsGen Biotechnologies (HspE7)	HPV-16 E7	Proteína/péptido	Fase II
Universidad de Leiden	HPV-16 E7	Péptido	Fase I II
Universidad de Queensland	HPV-16 E7	Péptido	Fase I II
Cantab (TA-HPV)	HPV-16/18 E6, E7	Virus vaccinia recombinante	Fase II
Comisión Europea, Academia de Ciencias Médicas China	HPV-58 E7	Virus vaccinia recombinante	Preclínico; previene el crecimiento del tumor en ratones
Universidad Johns Hopkins	HPV-16 E6,E7	Virus vaccinia recombinante con LAMP	Preclínico; elimina y previene tumor en ratones
Transgen (MVA-HPV-IL2)	HPV-16	Virus vaccinia MVA recombinante	Fase I
Instituto Wistar	HPV-16 E6, E7	Adenovirus recombinante y virus vaccinia	Preclínico;
MidiGene, Schering AG	HPV-16 L1, E7	VLP quimérico	Fase I/II

## II.2. ESTRATEGIAS

La nueva generación de vacunas emplea la ingeniería genética para su desarrollo; las estrategias utilizadas son muy diversas e incluyen:

(a) *Vectores recombinantes vivos o atenuados.* El uso de los organismos que causan la enfermedad, vivos o atenuados ha sido la idea tradicional para el diseño de vacunas, su ventaja principal es que al utilizar los organismo completos se despierta una fuerte respuesta inmune y generalmente se requieren pocas aplicaciones [55]. Algunos investigadores están trabajando actualmente con el virus vaccinia y el bacilo de Calmette-Gueérin (BCG), ya que su uso ha sido aceptado por las autoridades competentes y las compañías ya tienen experiencia con su manipulación. Dentro de las investigaciones para la elaboración de vacunas contra HPV se estudia el uso de vectores capaces de colonizar la mucosa como lo es adenovirus y *Salmonella* [56]. Una de las principales desventajas del uso de este tipo de sistemas es que no son seguros en individuos inmunocomprometidos, por esta razón es esencial proponer el uso nuevos vectores, cuya aplicación no represente un riesgo para la salud; un ejemplo de este tipo de esfuerzos es el realizado por la compañía francesa Transgene que ha desarrollado una cepa modificada del virus vaccinia Ankara (MVA) que expresa E6 y E7 de los HPV-16 y 18 y que es incapaz de crecer en células de mamífero [57]; con el mismo propósito Pozzi *et al* propone el uso de *Streptococcus gordonii* una bacteria capaz de colonizar mucosas para expresar la proteína E7 del HPV-16 e inducir inmunidad [58].

(b) *Péptidos y proteínas.* Las vacunas con subunidades proteicas y péptidos pueden evocar una respuesta inmune más segura y con pocos efectos colaterales. Para desarrollar estos sistemas los genes de interés son insertados dentro de levaduras u otro organismo con la finalidad de producir grandes cantidades del péptido o la proteína de elección. El principal problema aquí es la falta de un componente fuertemente inmunogénico que dispare la respuesta inmune, por tal motivo el uso de adyuvantes es un factor crítico para la eficiencia de estos modelos. Otra de las desventajas es que no son capaces de generar una fuerte respuesta inmune de tipo citotóxico, y generalmente se necesitan muchas aplicaciones para obtener una inmunidad protectora [56].

(c) *VLP's*. Estos modelos son ideales para el desarrollo de vacunas profilácticas, su diseño esta basado en el autoensamble de las proteínas L1 y L2, cuando son expresadas bajo un promotor fuerte en la ausencia de otros productos virales en una amplia variedad de células como son: células de insecto, levaduras y aún en bacterias [61]. Estas partículas asemejan a las virales, de tal forma que el sistema inmune percibe a los VLP's como virus infecciosos y responde a ellos [59], sin embargo, los VLP's no llevan DNA por lo cual no son infectivas, pero sí son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes aún sin la presencia de un adyuvante [60, 61]. Dentro de la nueva generación de VLP's se incluyen vacunas comestibles con expresión de VLP's, vectores vivos que expresan estas partículas intracelularmente por ejemplo *Salmonella typhimurium* [22] y DNA desnudo con la proteína L1 bajo un promotor fuerte que al ser inyectada en las células produce éstos VLP's [61]. Las principales desventajas en el uso de esta estrategia es que además de que su producción resulta cara, requiere refrigeración constante y múltiples aplicaciones para lograr que sea efectiva [62].

(d) *DNA desnudo*. Mediante el uso de tecnología recombinante genes del HPV son introducidos a pequeñas moléculas de DNA plasmídico bajo la regulación de un promotor eucariótico fuerte, la producción en masa del plásmido se realiza en bacterias, el cual es posteriormente es purificado e introducido como vacuna [63]. Investigaciones con vacunas de DNA en contra de varios patógenos incluyendo HPV, han encontrado que estos sistemas ofrecen varias ventajas entre las que se incluye que son potentes estimuladores de la respuesta inmune mediada por células, además de que la respuesta inmune resulta duradera, ya que la células hospedera continua produciendo el antígeno por años [64]. Sin embargo el uso de estas vacunas también presenta sus riesgos, el DNA puede ser insertado dentro del genoma del hospedero lo que podría causar mutaciones, interrumpir genes celulares y causar daño, además es posible que se generen anticuerpos anti-DNA causando algún fenómeno auto inmune [63]. Otra característica muy importante es que son incapaces de evocar una respuesta

inmune mucosal ya que no existen sistemas de aplicación nasal, oral o otra ruta mucosal [65]. Actualmente las investigaciones estan enfocadas en el uso de adyuvantes para facilitar la toma del DNA por las células, así como en el impacto de diferentes rutas de inmunización (intramuscular, intradermal, intratraqueal) sobre la respuesta inmune mucosal [63]. La Tabla 4 resume las estrategias que hasta el momento se han utilizado para el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas contra HPV y neoplasias relacionadas.

**Tabla 4. Estrategias para la elaboración de vacunas**

ESTRATEGIA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
VLP	Inducen fuerte respuesta inmune	Su producción a gran escala resulta cara, requiere de varias aplicaciones
DNA desnudo	Fácil de almacenar y distribuir	No prometen inmunidad mucosal fuerte
Proteínas y péptidos	Muy seguras, su producción resulta económica	Uso de adyuvantes, no son eficientes para generar LTC
Vectores virales	Inducen fuerte respuesta humoral y celular	No es segura en infantes e individuos inmunocomprometidos
Vectores Bacterianos	No requieren adyuvantes, fáciles de manipular	Los utilizados hasta el momento, no son seguros en infantes e individuos inmunocomprometidos

### III. SISTEMAS PARA LA INMUNIZACIÓN MUCOSAL

La superficie de las mucosas (tracto gastrointestinal, respiratorio, y urogenital) representa un área muy expuesta a agentes exógenos, y se convierte en una vía muy interesante para el desarrollo de vacunas contra infecciones del tracto respiratorio y urogenital. Basándose en el concepto de un sistema inmune mucosal a través del cual se activan linfocitos del intestino que pueden activar inmunidad también en otras mucosas y glándulas [37]. La superficie mucosal se encuentra protegida por el sistema inmune innato y adquirido, entre los que se incluyen el atrapar patógenos en el moco, (lo cual se ve aumentado por unión de la mucina a lecitinas de las bacterias), movimiento peristáltico y de los cilios del epitelio, el bajo pH en el

estómago, las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal, la competencia por nutrientes con los microorganismo comensales; además se considera que las células del epitelio mucosal constituyen también una primer línea de defensa ya que son capaces de inducir citocinas inflamatorias como IL-8 en respuesta a una estimulación [51]. La IgA secretoria es la inmunoglobulina predominante en la superficie de las mucosas, anticuerpos de tipo IgA son generados en el tracto gastrointestinal, respiratorio o genitourinario y pueden conferir protección contra infecciones que los afectan o se originan en estos sitios [40]. La disponibilidad de vacunas que induzcan secreción de IgA para la protección de mucosas e inmunidad sistémica para los patógenos que invaden el hospedero son el aspecto más interesante en la guerra contra las enfermedades infecciosas [38], de esta manera las vacunas mucosales disparan la respuesta de células inmunes en el sitio de la inducción y además puede inducir inmunidad mucosal y sistémica [38]. El origen de los precursores celulares de IgG e IgA destinados al tracto genital son desconocidos, pero hay evidencia indirecta que sugiere que sitios de inducción en la mucosa del recto, intestino y especialmente cavidad nasal contribuyen con ellos [41], varios estudios indican que la inmunización intranasal de varias especies, incluyendo humanos, es suficiente para inducir respuesta de anticuerpos específicos contra el antígeno en el tracto genital femenino [41]. En el ensayo de una vacuna contra HPV en la que se utilizó una cepa recombinante de *Salmonella* que expresaba LI, se analizó la eficiencia de diferentes rutas mucosales, los investigadores encontraron que la vía nasal era más efectiva, asimismo pudieron ser detectadas IgA e IgG también en secreciones orales y vaginales, lo cual indica el potencial protectorio de las mucosas [22].

### III.1. BACTERIAS COMO VEHICULOS

A pesar de que se han desarrollado varios sistemas no vivos para la presentación de antígenos, los vectores vivos tienen la ventaja de mejorar la respuesta inmune generada por dichos

sistemas aún sin la necesidad de múltiples aplicaciones [66]. Usualmente los vectores utilizados son bacterias Gram-negativas como *Salmonella* y *Mycobacterium*, las cuales se consideran patógenos de mamíferos [66]. Aunque estos organismos han sido extensamente modificados para reducir su patogenicidad y mantener sus cualidades invasivas [67] no se consideran totalmente seguros para su aplicación en infantes e individuos inmunosuprimidos, por lo tanto, con la finalidad de incrementar la seguridad de vectores recombinantes vivos, el interés se ha dirigido al uso de bacterias comensales y de grado alimenticio para el desarrollo de vacunas [68].

Las bacterias Gram-positivas empleadas para el desarrollo de vectores mucosales incluyen *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus spp*, *Streptococcus gordonii*, además especies no patogénicas de *Staphylococcus* y *Listeria* [68]; entre ellas las bacterias del ácido láctico (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) poseen una gran variedad de propiedades las cuales las hacen candidatas para propuestas de vacunación. Por ejemplo poseen propiedades adyuvantes, propiedades de adhesión a mucosas y baja inmunogenicidad intrínseca [30]. Algunas de ellas ya han sido utilizadas para diseñar vacunas, en un ensayo experimental se logró reducir el riesgo de acidosis láctica en ganado usando cepas de *Streptococcus bovis* y *Lactobacillus* [36], además lactobacilos comensales del tracto genital femenino han sido manipulados para la expresión de antígenos extraños y al ser aplicados directamente en mucosa vaginal de cerdos, lograron producir una fuerte respuesta mucosal local [39].

### III.2. *Lactococcus lactis* COMO MODELO

*Lactococcus* es una bacteria Gram-positiva de aproximadamente 1 µm de diámetro, algunas de sus cepas han sido ampliamente usadas en la industria alimenticia. Se trata de un microorganismo no patogénico, incapaz de colonizar el tracto digestivo del hombre y otros

animales [69, 70] aunque es capaz de sobrevivir al paso por el tracto digestivo [70]. *Lactococcus* tiene un tamaño similar al de micropartículas degradables las cuales se sabe son tomadas por las células M, por lo que se considera capaz de ser procesado y presentado por el sistema inmune mucosal (Figura 7) [43].

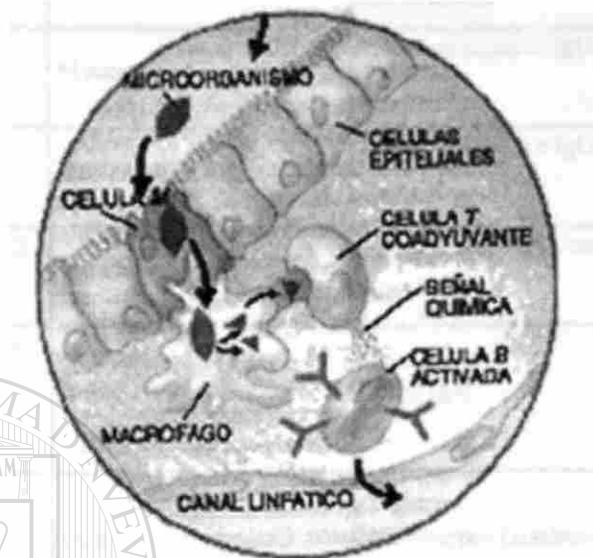


Figura 7. Representación del tráfico celular del sistema inmune mucosal.

En 1990 se desarrolló con esta bacteria un sistema de expresión del antígeno PAc de *Streptococcus mutans* con la finalidad de desarrollar una vacuna oral contra caries dental, con este sistema fue posible inducir una respuesta inmune de tipo IgA en saliva e IgG en suero cuando se administró oralmente en ratones [49]. Estos resultados marcaron el inicio de una serie de investigaciones sobre el gran potencial de *Lactococcus lactis* como vector para la expresión de antígenos, actualmente *Lactococcus lactis* ha sido utilizada para la expresión de una variedad de antígenos (Tabla 5), con lo que se ha logrado determinar que *Lactococcus lactis* es capaz de expresar una cantidad sustancial de proteínas heterólogas (antígenos) y además los puede presentar al sistema inmune de una forma inmunogénica [50].

**Tabla 5. Antígenos expresados en *Lactococcus lactis***

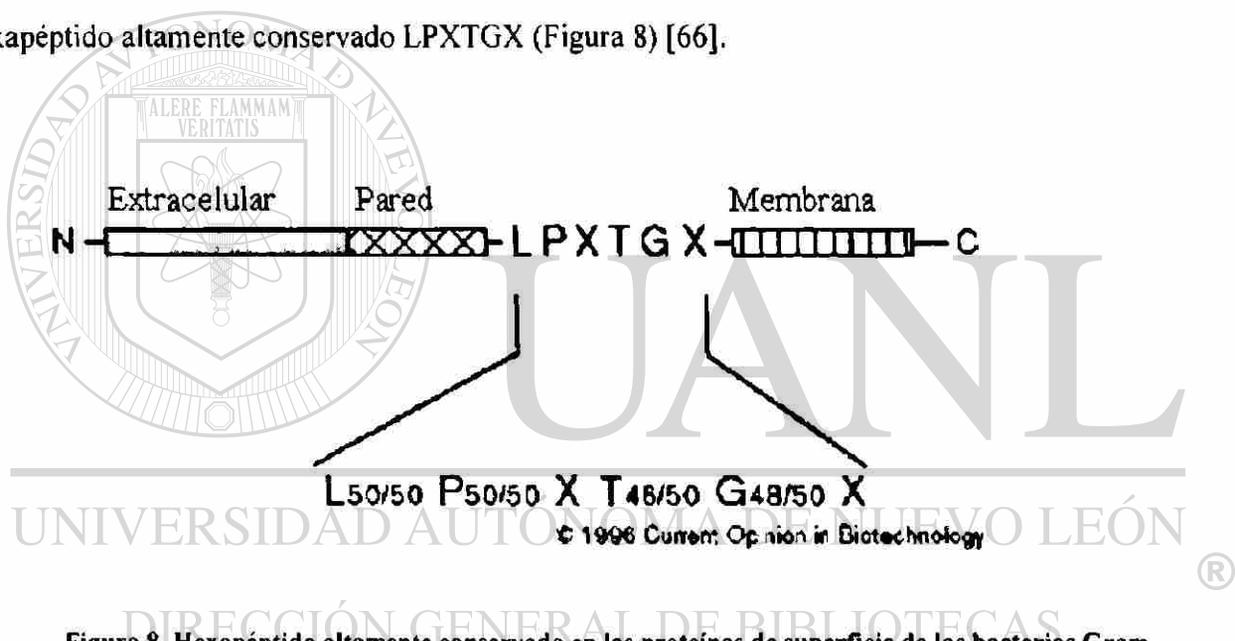
Antígeno	Vía de inoculación	Tipo de Respuesta	Referencia
PAC ( <i>Streptococcus mutans</i> )	Oral	IgA e IgG	[49]
Fragmento C de la toxina del tétanos (TTFC)	Subcutáneo	Protección contra el reto con la toxina	[50]
TTFC	Mucosal	IgA en mucosas e IgG en suero	[46]
TTFC	Intranasal	IgA en mucosas e IgG en suero	[44]
Co-expresión TTFC, IL-2, IL-6	Intranasal	IgA en heces e IgG en suero	[42]
Polisacárido capsular tipo 3 (CPS) de <i>Streptococcus pneumonia</i>	Intraperitoneal	IgG e IgM	[71]
Subunidad B de la ureasa (UreB) de <i>Helicobacter pylori</i>	Oral	Anticuerpos (sistémico)	[72]
Proteína 4 no estructural (NSP4) de rotavirus bovino	Intramuscular	Anticuerpos en suero	[73]
Beta-Lactoglobulina	Nasal/oral	IgA en heces	[74]

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

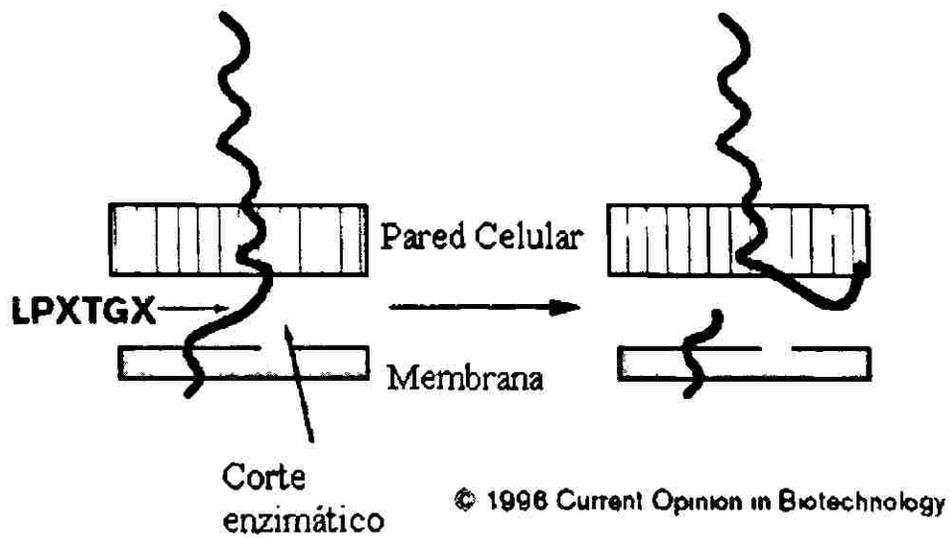
Un aspecto muy importante a considerar es el efecto de la vía de inoculación de *Lactococcus lactis* sobre la respuesta inmune, ya que se ha observado que la inmunogenicidad varía de acuerdo a la vía de inoculación [47]. Sin embargo son varios los experimentos que demuestran la eficiencia de la inmunización nasal [42, 44, 74], incluso se ha logrado obtener un mayor título de anticuerpos después de una inmunización nasal, comparada con una oral [43]. Otro de los factores que afecta la inmunogenicidad es la forma en que se expresa la proteína, siendo significativamente más inmunogénica cuando está asociada a superficie [45], aunque desde hace tiempo se ha incrementado el interés en la presentación de moléculas heterólogas en la superficie de bacterias [76]. Los resultados de las investigaciones recientes

revelan que éste podría ser el mejor mecanismo de presentación de antígenos en bacterias Gram-positivas como *Lactococcus lactis* [45], debido a que la peptidoglicana de la pared celular es un adyuvante natural, lo que sugiere un aumento en la respuesta obtenida cuando se utilizan organismo modificados de esta manera [66]. Los mecanismos de unión a superficie de las bacterias Gram-positivas son muy conservados, en ellos la región responsable de la unión a la superficie celular es la fracción carboxilo terminal de la proteína. En esta región se localizan aproximadamente seis aminoácidos cargados, adyacentes a una región hidrofóbica de entre 15-20 aminoácidos, esto hace que la región carboxilo funcione como una secuencia de paro para la molécula [77], inmediatamente después de esa región se encuentra el hexapéptido altamente conservado LPXTGX (Figura 8) [66].



**Figura 8. Hexapéptido altamente conservado en las proteínas de superficie de las bacterias Gram-positivas**

Ciertas investigaciones sugieren que este motivo podría actuar como sitio de reconocimiento enzimático para realizar un corte que permita la unión a la pared celular, exponiendo la región amino de la proteína en la superficie (Figura 9) [66, 78].

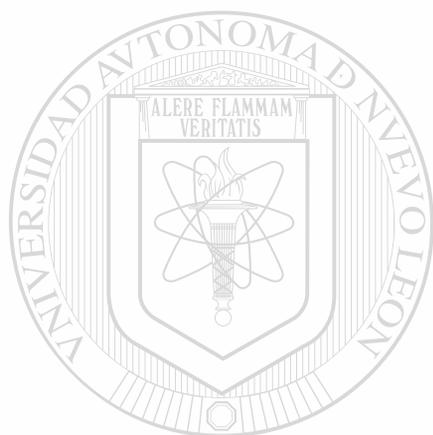


**Figura 9. Mecanismo de anclaje en bacterias Gram-positivas**

La proteína M6 de *Streptococcus pyogenes* es considerada una de las proteínas de superficie mejor caracterizadas, y ha sido satisfactoriamente utilizada para fusionar proteínas y expresarlas en la superficie de *Streptococcus gordonii* [66] además en varias bacterias lácticas como *Lactococcus lactis* [76].

## IMPORTANCIA

En nuestro país le CaCu es un problema serio, considerado como el cáncer más frecuente entre la población femenina con un alto índice de mortalidad. A pesar de los considerables esfuerzos que se han hecho para combatirlo las estrategias utilizadas hasta el momento resultan poco prácticas o incluso peligrosas para individuos inmunosuprimidos. Este trabajo presenta una nueva alternativa, al utilizar por primera vez una bacteria grado-alimenticio como vehículo para la presentación del antígeno E7.



# UANL

## HIPÓTESIS

---

Es posible inducir una respuesta inmune en contra del antígeno E7 mediante la administración nasal de una cepa de *Lactococcus lactis* que expresa el antígeno E7 sobre su superficie

## OBJETIVO GENERAL

Expresar la oncoproteína E7 del papilomavirus humano HPV-16 sobre la superficie de *Lactococcus lactis* y evaluar su capacidad para inducir una respuesta inmune.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Construir un plásmido recombinante para la expresión de la proteína E7 del HPV-16 anclada a la pared celular de *Lactococcus lactis*.
2. Transformar *Lactococcus lactis* con los vectores recombinantes diseñados.
3. Determinar si la proteína E7 se encuentra anclada a la pared celular de *Lactococcus lactis*.
4. Determinar si las bacterias recombinantes de *Lactococcus lactis* inducen una respuesta inmune humoral contra E7.
5. Determinar si las bacterias recombinantes de *Lactococcus lactis* inducen la producción de citocinas relacionadas con la respuesta inmune de tipo celular.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para expresar la proteína E7 sobre la superficie de *Lactococcus lactis* se construirá un plásmido recombinante en donde el gen E7 será fusionado por su extremo 5' con la señal de secreción de la proteína nativa de *Lactococcus lactis* Usp45, y por su extremo 3' con un segmento de la proteína M6 de *Streptococcus pyogenes* correspondiente a la señal de anclaje LPXTGX. Con este vector se transformará *Lactococcus lactis* para lograr la expresión de E7 anclada a pared celular. La cepa recombinante construida será utilizada para inmunizar ratones vía intranasal. Con el propósito de evaluar su capacidad para inducir una respuesta inmune de tipo humoral, el suero de los ratones inmunizados se utilizará en ensayos de tipo Western Blot. La posible relación entre la administración nasal de la bacteria recombinante y la respuesta inmune de tipo celular se evaluará mediante un ensayo con las células de bazo de los ratones inmunizados en el cual se medirá la inducción de dos importantes citocinas involucradas en este tipo de respuesta, INF- $\gamma$  e IL-2.

## MATERIAL

### MATERIAL BIOLÓGICO

#### Cepas

<i>Escherichia coli</i>	Descripción	Referencia
JMI09	F <sup>'</sup> traD36lacIq Δ(lacZ) M15 proA+B+ e14-(McrA) Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nalr) end A1 hsdR17 (rk- mk+) relA1 supE44 recA1	Promega
TGI	F <sup>'</sup> traD36lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ) M15 proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> /supE Δ (hsdM- mcrB) 5 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> McrB <sup>-</sup> ) thi Δ(lac-proAB)	Colec.Recherches Laitières, INRA
BL21:GST		Dr. Alcocer
BL21:GST:E7		Dr. Alcocer

<i>Lactococcus lactis</i>	Descripción	Referencia
MG1363	<i>Lactococcus lactis</i> subs. <i>cremoris</i>	Colec.Recherches Laitières, INRA
NZ9000	<i>Lactococcus lactis</i> subs. <i>cremoris</i> , derivada de MG1363 <i>pepN. nisR nisK</i>	Colec.Recherches Laitières, INRA

pSEC NZ9000:E7 de secreción [75]

#### Plásmidos

Nombre	Descripción	Referencia
pCDNA3E7	pCDNA3:gene E7 HPV-16	Alcocer JM
pGEMT		Promega
pVE5547	pBS:P <sub>nisA</sub> :NucA:CWA-long:pIL252	Colec.Recherches Laitières, INRA
PVE3684-Trp	pGK:P <sub>nisA</sub> :SP:E7:Trp	[75]
pVE5547-E7	pBS:E7:CWA-long:pIL252	Este Trabajo
pVE3684-E7:	pGK:P <sub>nisA</sub> :SP:E7-CWA-long	Este Trabajo

## ENZIMAS

Enzimas de restricción

*Sall*

*EcoRV*

*BglII*

*SpeI*

Enzimas de modificación

Taq pol

T4 DNA Ligasa

Lisozima

Mutanolisina

RNAsa

## KIT'S

Gene Clean II (Promega)

pGEM T, (Promega)

Midipreps Wizard Plus (Promega)

## REACTIVOS

Acetato de Potasio

ICN

Acetato de Sodio

ICN

Acrilamida/Bisacrilamida 30%

BIORAD

Ampicilina

SIGMA

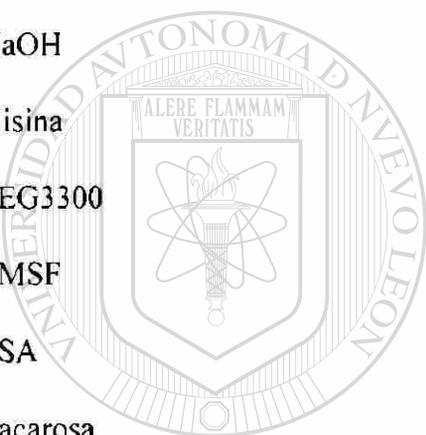
Cloranfenicol

SIGMA

DTT

Research organics

EDTA	SIGMA
Eritromicina	SIGMA
Etanol	Merck
Filtros Millex-GS 22µm	MILIPORE
Glicerol	Fisher
Glicina	SIGMA
Glucosa	DEQ
Isopropanol	Merck
M17	DIFCO
NaOH	SIGMA
Nisina	SIGMA
PEG3300	SIGMA
PMSF	SIGMA
PSA	SIGMA
Sacarosa	SIGMA
SDS	SIGMA
TCA	SIGMA
TEMED	Research Organics
Tris	USBiological
Papel filtro 3MM	
Membranas PVDF	ROCHE



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## **EQUIPO**

Cámara de Transferencia semiseca modelo HEP-1 Owl

Cámaras de electroforesis

Electroporador BTX modelo ECM 630

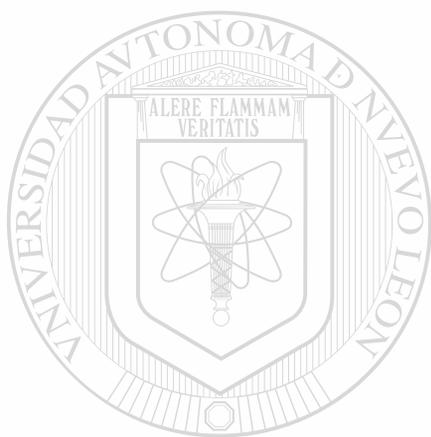
Fuente de Poder Thermo EC, modelo EC500-90

Incubadora

Microcentrífuga eppendorf

Ultracentrífuga BEKMAN Avanti™ J-251

Vortex



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## METODOLOGIA

### I. CONSTRUCCION DE PLASMIDOS RECOMBINANTES

Para la expresión de la proteína E7 sobre la superficie de *Lactococcus lactis* el gen E7 del HPV-16 se clonó en fase de lectura con dos diferentes señales, en el extremo 5' con la señal de secreción de la proteína usp45 de *Lactococcus lactis* y en su extremo 3' con un segmento de la proteína M6 de *Streptococcus pyogenes* correspondiente a la señal de anclaje a membrana el cual incluye el motivo LPXTGX; bajo la regulación de un promotor inducible ( $P_{msA}$ ).

**I.1 Amplificación de E7.** Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos para dejar en fase de lectura en su extremo 5' con la usp45 y por su extremo 3' con la señal de anclaje CWA además de agregar dos sitios de restricción;

E7/SalI 5'-AGTCGACCCATTGCATGGAGATACACCTACATTG-3' y

E7 EcoRV 5'-CGATATCTCTGGTTTCTGAGAACAGATGGGGCA-3' con estos oligos se amplificó por PCR un segmento de 315 pb del plásmido pCDNA3E7.

Programa

94°C 4min

94°C 1min

55°C 1min

72°C 2min

72°C 7 min



34 ciclos

El producto de esta reacción se purificó por el sistema Gene Clean II (Promega) y se ligó al vector de clonación para productos de PCR pGEM T (Promega). Este plásmido se nombró pGEMT-E7 y con él se transformó la cepa JM109 de *Escherichia coli*.

### Reacción de ligación en pGEM T

<i>Buffer 2X</i>	<i>5 µl</i>
<i>pGEM-T easy vector</i>	<i>1 µl</i>
<i>E7 (purificado)</i>	<i>3 µl</i>
<i>T4 DNA ligasa</i>	<i>1 µl</i>
<hr/>	
	<i>10 µl</i>

I.2. Clonación bajo la regulación de un promotor inducible ( $P_{nlsA}$ ). El fragmento liberado con *Sall* y *EcoRV* del pGEMT-E7 se purificó por el sistema Gene clean II, se clonó en pVE5547 previamente digerido con las mismas enzimas. Este vector contiene la señal de secreción y la de anclaje entre las cuales se fusionó el gen E7. De este vector se obtuvo el segmento usp45-E7-M6 (1200 pb) mediante una digestión con *BglII-SpeI* y se integró en el plásmido pVE3684-trp digerido con las mismas enzimas. De esta manera el segmento usp45-E7-M6 quedó bajo la regulación del promotor inducible ( $P_{nlsA}$ ). La construcción obtenida se nombró pVE3684-E7.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### Reacciones de Digestión

<i>pVE5547</i>	<i>5 µl</i>	<i>pGEM-E7</i>	<i>5 µl</i>
<i>Sall</i>	<i>1 µl</i>	<i>Sall</i>	<i>1 µl</i>
<i>EcoRV</i>	<i>1 µl</i>	<i>EcoRV</i>	<i>1 µl</i>
<i>Buffer H</i>	<i>5 µl</i>	<i>Buffer H</i>	<i>5 µl</i>
<i>Agua</i>	<i>38 µl</i>	<i>Agua</i>	<i>38 µl</i>
<hr/>		<hr/>	
	<i>50 µl</i>		<i>50 µl</i>

<i>pVE5547-E7</i>	5 $\mu$ l	<i>pVE3684-Trp</i>	5 $\mu$ l
<i>BglII</i>	1 $\mu$ l	<i>BglII</i>	1 $\mu$ l
<i>SpeI</i>	1 $\mu$ l	<i>SpeI</i>	1 $\mu$ l
<i>Buffer H</i>	5 $\mu$ l	<i>Buffer H</i>	5 $\mu$ l
<i>Agua</i>	38 $\mu$ l	<i>Agua</i>	38 $\mu$ l
	<hr/>		<hr/>
	50 $\mu$ l		50 $\mu$ l

#### Reacciones de Ligación.

<i>pVE5547</i>	3 $\mu$ l	<i>pVE3684-Trp</i>	3 $\mu$ l
<i>E7</i>	9 $\mu$ l	<i>Usp:E7:CWA</i>	5 $\mu$ l
<i>Buffer 10X</i>	1.5 $\mu$ l	<i>Buffer 10X</i>	1.5 $\mu$ l
<i>T4 DNA Ligasa</i>	1 $\mu$ l	<i>T4 DNA Ligasa</i>	1 $\mu$ l
<i>Agua</i>	0.5 $\mu$ l	<i>Agua</i>	4.5 $\mu$ l
	<hr/>		<hr/>
	15 $\mu$ l		15 $\mu$ l

## II. TRANSFORMACIÓN

### II.1. *Escherichia coli*

**II.1.1. Preparación de células Calcio-competentes.** Se reactivó la cepa almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  en LB agar y se dejó en incubación 24 hrs, posteriormente se tomó una colonia y se inocularon 5 ml de caldo LB y se incubó toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  y 150 rpm. Con 1 ml de este cultivo, se inocularon 100 ml de caldo LB y se dejó en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  y 150 rpm hasta que alcanzó una  $\text{DO}_{550}$  de 0.6, posteriormente se colocó en hielo por 10 min para detener el crecimiento. Se utilizaron frascos para ultracentrífuga preenfriados y estériles y se centrifugó a 7000 rpm 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 10 ml de una solución fría de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M, y se incubó durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , posteriormente se centrifugó a iguales condiciones que el paso anterior, se eliminó el sobrenadante, se repitió el

lavado con la solución de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M, finalmente la pastilla se resuspendió en 0.5 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M y 0.5 ml de glicerol al 50% ambas frías y estériles. Se hicieron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de bacterias e inmediatamente se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

**II.1.2. Transformación.** Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de bacterias calcio competentes, se agregaron 5  $\mu\text{l}$  de los productos de ligación (pGEM-E7) y se incubó en hielo durante 20 min, luego se aplicó un choque térmico a  $42^\circ\text{C}$  durante 50 segundos, inmediatamente después se colocó el tubo en hielo por 2 min, se agregaron 945  $\mu\text{l}$  de medio SOC y se dejó en incubación a  $37^\circ\text{C}$  y 150 rpm durante 2 horas, posteriormente se centrifugó por 10 pulsos, para concentrar las células en aproximadamente 200  $\mu\text{l}$ , se sembraron 100  $\mu\text{l}$  de estas bacterias transformadas sobre placas LB agar ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  X-Gal e IPTG, y se incubaron por 24 hrs a  $37^\circ\text{C}$ .

**II.1.3. Selección de Clonas.** Se seleccionaron aquellas colonias blancas y grandes que fueron capaces de crecer en el medio LB ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), X-GAL e IPTG. Se tomó una asada de las colonias obtenidas de la transformación y se inocularon 3 ml de medio LB ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), se dejaron incubar toda la noche a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente se les realizó una extracción de DNA plasmídico, aquellas clonas que fueron positivas para la presencia del plásmido pGEM-E7 fueron almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$  en una solución de glicerol al 50%.

## II.2. *Lactococcus lactis*

**II.2.1. Preparación de células electrocompetentes.** Se hizo un preinoculo de la cepa que se encontraba almacenada a  $-80^\circ\text{C}$  en 5 ml de medio GM17 y se incubó toda la noche a  $30^\circ\text{C}$ . Se tomó 100 (2 ml) del cultivo anterior para inocular 222 ml de medio GM17SG y se dejó en incubación hasta alcanzar una  $\text{OD}_{600}$  de entre 0.5-0.8 (normalmente 0.6) a  $30^\circ\text{C}$ . Una vez alcanzada la densidad óptica, el medio se repartió en 6 tubos de 50 ml y se centrifugó a 7500

rpm/10 min a 4° C en una ultracentrífuga BECKMAN Avanti™ J-251 para obtener el paquete celular. Posteriormente el paquete de células se lavó con 30 ml (cada tubo) de Buffer de lavado frío. Se descartó el sobrenadante y éste paso se repitió dos veces más. Después del ultimo lavado, se eliminó el sobrenadante de los 6 tubos y se dio un lavado final, para concentrar el contenido de los 6 tubos en uno solo. La pastilla celular se resuspendió delicadamente en 1 ml de una solución fría de PEG3300 30% y 10% glicerol. Se hicieron alícuotas de 100 µL y se almacenaron a -80°C.

**II.2.2. Electrotransformación.** Se tomaron 100 µl de células electrocompetentes, se agregaron 10 µl del producto de la ligación, se transfirió a una celda para electroporador (fría) de 4 mm y se incubó 5 min en hielo. La celda se colocó en el aparato y se aplicó un choque eléctrico bajo las siguientes condiciones: 2500 V, 25 µF y 200 Ω en un electroporador BTX modelo ECM 630. Una vez transcurrido el tiempo del pulso se retiró la celda y se agregaron 900 µl de GM17, después el contenido de la celda se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se dejó en incubación 2 hrs a 30° C. Se centrifugó por 2 pulsos en microcentrífuga eppendorf®, se eliminaron 900 µl de sobrenadante y en el resto se resuspendió bien el paquete celular; se tomaron 50 µl de esta solución y se sembró por extensión sobre placas de agar GM17 con antibiótico.

**II.2.3. Selección de Clonas.** Los vectores utilizados en este trabajo poseen un gen de resistencia a antibióticos, en el caso de los vectores pVE5547, para eritromicina y pVE3684 para cloranfenicol. Por lo tanto se seleccionaron como clonas transformadas aquellas que fueron capaces de crecer en un medio con eritromicina a una concentración de 5 µg/ml, ó cloranfenicol a una concentración de 10 µg/ml. Se tomó una asada de las colonias obtenidas de la transformación y se inocularon 3 ml de medio GM17 con antibiótico; se dejaron incubar

toda la noche a 30°C, posteriormente se les realizó una extracción de DNA plasmídico. Aquellas clonas que fueron positivas para la presencia del plásmido fueron almacenadas a -80° C en una solución de glicerol al 50%.

### III. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

#### III.1 Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala

**III.1.1 *Escherichia coli*.** Se tomaron 2 ml de un cultivo saturado y se centrifugó a 10000 rpm 2 min. la pastilla celular se resuspendió en 100 µl de la solución I, se agregaron 300 µl de la solución II, se mezcló bien por inversión y posteriormente se agregaron 200 µl de la solución III para formar un precipitado blanco, el cual se separó y eliminó mediante una centrifugación a 14000 rpm/8 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se agregó 1 volumen de isopropanol y 1/10 de la solución III, luego se centrifugó a 14000 rpm/8 min, la pastilla se lavó con 1 ml de Etanol 70% y finalmente el DNA se resuspendió en 30 µl de agua estéril, además de 5 µl de RNAasa 10 mg/ml.

**III.1.2. *Lactococcus lactis*.** Se obtuvo el precipitado de 2 ml del cultivo mediante una centrifugación a 14000 rpm/5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 200 µl de la solución IL y se incubó 30 min a 37°C. Se agregaron 200 µl solución IIL y se agitó muy ligeramente con vortex. Se precipitaron las proteínas al añadir 200 µl de solución IIIL y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm/15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µl de solución IVL, se mezcló con ayuda de un vortex y se centrifugó a 14000 rpm/10 min a 4°C. Inmediatamente después el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo; para precipitar el DNA se adicionó 1/10 (45 µl) de solución IIIL y 1 volumen (450 µl) de Isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm/15 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado de la pastilla

con una solución fría de etanol al 70%. Se dejó secar el DNA y se resuspendió en 20  $\mu$ l de buffer TE con 5  $\mu$ l de RNAasa 10 mg/ml.

### III.2 Aislamiento de DNA a mediana escala

Se utilizó el Kit Wizard<sup>®</sup> Plus Midipreps de Promega, con todas sus especificaciones, solo se hizo una modificación para las células de *Lactococcus lactis* en las cuales la solución de resuspensión celular del Kit, se sustituyó por una solución de Lisozima a 10 mg/ml con la finalidad de eliminar la pared celular.

## IV. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE E7 SOBRE LA PARED DE *Lactococcus lactis*.

### IV.1. Preparación de Extractos

**IV.1.1 Extractos Totales.** Se inocularon 3 ml de medio GM17 cloranfenicol con 20  $\mu$ l de la cepa almacenada en glicerol a -80°C, y se dejó en incubación a 30°C toda la noche. Al día siguiente se tomaron 100  $\mu$ l de estas bacterias para inocular 5 ml de medio de cultivo nuevo, se dejó en incubación a 30°C hasta que alcanzaron una DO<sub>600</sub> de entre 0.4-0.5, a esta DO se realizó la inducción con 10 ng/ml de nisina en aquellas cepas que poseen el promotor<sup>®</sup> inducible con nisina y se incubó durante 1 hora más (en este tiempo las bacterias alcanzaron una DO<sub>600</sub> de entre 0.9-1 y se comenzaron a procesar).

Para obtener los extractos totales de 2 fracciones correspondientes a fracción celular y fracción medio de cultivo (sobrenadante) se procedió de la siguiente manera. Se centrifugaron 2 ml de cultivo a 14000 rpm/3 min a 4°C, la pastilla celular se resuspendió en 50 x DO de TES-LM, 5  $\mu$ l de PMSF 1 M más 1  $\mu$ l de DTT 100 mM y se incubó 30 min a 37°C, posteriormente se añadió 1/2 del volumen anterior de SDS al 20% se mezcló muy bien con

vortex durante 1 min y se añadió 1 volumen de DTT-LB. Además de 5 µl de PMSF 1 M, a esta fracción se le nombró *fracción citoplásmica*, y se mantuvo a -20°C hasta su uso, sin que éste excediera 72 horas. El sobrenadante se filtró a través de filtros Millex-GS de 22 µm (Milipore), se recuperaron 1.4 ml del sobrenadante filtrado, se agregaron 100 µl de TCA al 100% y se incubó en hielo durante 15 min para precipitar las proteínas; posteriormente se centrifugó a 14000 rpm/15 min a 4°C, la pastilla proteica obtenida se resuspendió en 25 µl de NaOH (50 mM) mas 1 volumen de DTT-LB y 5 µl de PMSF 1 M, esta fracción se nombró *sobrenadante* y se mantuvo a -20°C hasta su uso, sin que éste excediera 72 horas.

**IV.1.2 Separación en tres fracciones.** Se procedió igual que para la preparación de extractos totales, hasta el paso de obtener la pastilla celular y el sobrenadante de 2 ml de cultivo. La fracción del sobrenadante se procesó exactamente igual que en la obtención de extractos totales. El paquete celular se resuspendió en 500 µl de TES-LM, 5 µl de PMSF 1 M mas 1 µl de DTT 100 mM y se incubó 1 hora a 37°C, trascurrido este tiempo se centrifugó a 14000 rpm/15 min a 4°C. De aquí se separaron dos fracciones, la correspondiente al citoplasma (precipitado) y la pared celular (fase acuosa). El precipitado se lavó con 100 µl de TES, para luego resuspenderse en 100 µl X DO de TE y 5 µl de SDS al 20%, además se agregó 1 volumen de DTT-LB más 5 µl de PMSF 1 M. Esta fracción se nombró *citoplásmica* y se mantuvo a -20°C igual que las anteriores. La fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y se añadieron 40 µl de TCA al 100% y se incubó en hielo durante 15 minutos, para posteriormente centrifugar a 14000 rpm/15 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 20 X DO de NaOH 50 mM mas 1 volumen de DTT-LB; esta fracción se nombró *pared celular* e igualmente se mantuvo a -20° hasta su uso.

**IV.1.3. Separación en cuatro fracciones.** Para este fin, las fracciones correspondientes a sobrenadante y pared celular, fueron procesadas como se describió con anterioridad. La fracción citoplásmica se recuperó después de centrifugar el producto de la lisis con TES-LM (en este caso el precipitado se resuspendió en 500 µl de agua y se aplicaron 4 ciclos de congelación descongelación en nitrógeno líquido), posteriormente se centrifugó a 14000 rpm/45 min y la fase acuosa se transfirió a otro tubo. Se agregaron 100 µl de TCA al 100% y se incubó en hielo 10 min, para luego centrifugar a 14000 rpm/15 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 50 X DO de TE, más 5 µl de PMSF 1 M, y 1 volumen de DTT-LB, esta fracción se nombró *citoplasma*. El precipitado obtenido después del tratamiento de congelación, se resuspendió en 250 µl de agua y 50 µl de TCA al 100% e incubado 15 min en hielo, se centrifugó a 14000 rpm/15 min a 4°C, para después resuspender en 50 x DO de TE, 20 µl de SDS 20%, 1 volumen de DTT-LB, más 5 µl de PMSF 1 M; esta fracción se nombró *membrana*.

## **IV.2. SDS-PAGE**

Se prepararon geles al 10 y 12% con una solución de Acrilamida/Bis 19:1 al 30% de BIO-RAD. Se utilizó una cámara de electroforesis vertical de Owl, bajo las siguientes condiciones de migración: 80 V para el gel concentrador y 100 V (20 mA) para el gel de resolución.

## **IV.3. Transferencia**

Después del corrimiento el gel se incubó 5 min en Buffer de Transferencia, el papel filtro 3MM se saturó en el mismo buffer, se utilizaron membranas PVDF (ROCHE), las cuales primero se trataron con metanol y posteriormente se incubaron en el buffer. Se utilizó una cámara de transferencia semi-seca de Owl, modelo HEP-1. La transferencia se realizó bajo las

siguientes condiciones: 2 hrs 14 V, 200 mA y 2 W para una membrana de 40 cm<sup>2</sup>, con una fuente de poder Thermo EC, modelo EC500-90.

#### **IV.4 Western Blot**

La membrana se retiró de la cámara y se transfirió a un recipiente con 30 ml de la solución bloqueadora, en la cual se incubó 1 hr a temperatura ambiente. Se retiró la solución bloqueadora, se agregó el primer anticuerpo anti-E7 ED17 (Santa Cruz) a una dilución 1:500 en TBS-Tween-leche 2% y se incubó toda la noche a 4°C.

El primer anticuerpo se retiró y se almacenó a -20°C, la membrana se lavó tres veces con TBS Tween, con periodos de incubación de 15 min cada lavado. Después del último lavado se añadió Proteína G unida a fosfatasa alcalina, a una dilución 1:1000 en TBS-Tween-Leche 2%, y se incubó 1 hr a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la membrana se lavó nuevamente en 3 ocasiones con TBS-Tween, además se realizó una incubación de 10 min en 20 ml de Solución Diluyente del Sustrato. Para desarrollar la reacción se utilizó el reactivo quimioluminiscente CDP-Star<sup>®</sup>, la membrana previamente escurrida se incubó 5 min en esta solución, se eliminó el exceso, y se realizó la exposición de 5 min a una película para diagnóstico T-Mat<sup>®</sup> G/RA de Kodak.

#### **IV.5 Inmunofluorescencia**

De un preinoculo con las cepas recombinantes en GM17 cloranfenicol, se tomaron 100 µl del cultivo saturado e inoculamos 5 ml de GM17 cloranfenicol, se dejó en incubación hasta una DO<sub>600</sub> de 0.4, y se realizó la inducción con 10 ng/ml de nisina; después de 1 hora más de incubación se registró nuevamente la DO. El paquete celular obtenido (DO<sub>600</sub> 0.7) por centrifugación (5000 rpm/2 min), a partir de 2 ml de cultivo, se resuspendió en 1 ml de una solución PBS-BSA 3% que contenía el primer anticuerpo anti-E7 ED17 de Santa Cruz a una

dilución de 1:500. Se dejó en incubación toda la noche a temperatura ambiente con movimiento. Al siguiente día se centrifugó (5000 rpm/2 min) para retirar el anticuerpo y se hicieron 5 lavados con 500  $\mu$ l de PBS –Tween 0.05%, luego se agregaron 100  $\mu$ l de una dilución 1:50 en PBS-BSA 3% del segundo anticuerpo anti-IgG ratón conjugado (Alexa-Fluor) y se incubó cubierto de la luz a temperatura ambiente toda la noche con movimiento. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0.05%, finalmente las células se resuspendieron en 30  $\mu$ l de PBS 1X, se realizó un frotis con 10  $\mu$ l, se fijó a la flama de mechero, y se observó la fluorescencia color rojo en un microscopio confocal. Como control negativo de la reacción se utilizó la cepa silvestre (MG1363). Debido a que existe la posibilidad de una reacción inespecífica, se utilizó también un control de la cepa productora de E7 (NZ9000/pVE3684:E7) sin primer anticuerpo (ED17).

#### **IV.6. Determinación de la concentración de E7 en cepas productoras**

Para determinar la producción de E7 en la bacteria recombinante construida se realizó una comparación con una cepa que es capaz de secretar E7 al medio de cultivo (pSEC-E7) y de la cual se conoce la cantidad de producción [75]. Se realizó un extracto total de la cepa productora, y de la cepa pSEC-E7. Posteriormente se realizó un Western Blot con la fracción citoplásmica de la cepa productora de E7:M6 y con el sobrenadante de la cepa pSEC-E7. La comparación de la producción se realizó por densitometría con el equipo UVP.

### **V. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA E7 EN RATONES**

#### **V.1. Preparación de células**

Se cultivaron las células en 20 ml de GM17-cloranfenicol hasta una  $DO_{600}$  de 0.5, se agregó nisina a una concentración de 10 ng/ml y se dejó incubar hasta una  $DO_{600}$  de 1.0. Se

centrifugó a 7500 rpm para recuperar la pastilla, y se hicieron 3 lavados con PBS, finalmente las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS.

## V.2. Inmunización

Grupos de 5 ratones C57BL/6J hembras de entre 5-8 semanas de edad fueron parcialmente anestesiados con Xilacina vía intramuscular. Se tomaron 20  $\mu$ l ( $1 \times 10^9$  células) de las bacterias productoras de E7 (NZ9000/pVE3684:E7) con una micropipeta y se aplicaron 10  $\mu$ l en cada nostrilo, gota a gota y esperando que se absorbiera bien. De igual manera fueron inmunizados los ratones control con una cepa de *Lactococcus lactis* que porta el plásmido pVE3684, así como con la cepa silvestre (MG1363).

## V.3. Obtención de suero

Se obtuvo sangre por vía retroorbital 7 días después de la última inmunización y se separó el suero, el cual se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**V.4. Western Blot.** Se realizaron extractos proteicos totales de la cepa productora de E7 (NZ9000/pVE3684:E7), y de la cepa silvestre (MG1363) como control negativo; se utilizaron las fracciones citoplásmicas de estas cepas para realizar el Western Blot, en el cual se probó el suero de los ratones inmunizados como primer anticuerpo. Como medida confirmatoria se realizaron extractos totales de la cepa BL21:GST:E7 y la cepa BL21:GST de igual forma mediante un Western-Blot con el suero de los ratones inmunizados como primer anticuerpo se analizó la respuesta inmune de tipo IgG.

## **VI. EVALUACIÓN DE CITOCINAS RELACIONADAS CON LA RESPUESTA INMUNE CELULAR**

### **VI.1. Obtención de células de bazo**

Siete días después de la última inmunización los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Bajo condiciones de esterilidad se obtuvo el bazo, se le agregó 1 ml de medio de cultivo AIM-V (GIBCO), para ser perfectamente macerado, posteriormente las células fueron transferidas cuidadosamente a un tubo estéril de 15 ml con 1 ml de HISTOPAQUE (SIGMA), y se centrifugó a 2500 rpm/25 min para separar las células mononucleares mediante un gradiente de densidad. La fase blanca (células mononucleares) se recuperó y transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml, se realizaron 2 lavados con 500  $\mu$ l de AIM-V, y finalmente se resuspendieron en 500  $\mu$ l del mismo medio y se hizo un conteo de las células con azul tripano.

### **VI.2. CULTIVO DE CELULAS**

Se utilizaron cajas de cultivo con capacidad de 2 ml por pozo, a cada pozo se agregaron  $2 \times 10^6$  células. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: (1) 50  $\mu$ l de Fitohemaglutinina, (2) 50  $\mu$ l de agua estéril y (3) 2  $\mu$ g de péptido E7 (RAHYNIVTF). Se completó a un volumen de 2 ml con medio AIM-V y se dejó 24 hrs en incubación a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **VI.3. ELISA**

Se tomaron 1.5 ml de cultivo, el cual se centrifugó a 5000 rpm/10 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -20°C hasta su uso. La determinación de INF- $\gamma$  e IL-2 se realizó mediante un ELISA con los Kit's mouse INF- $\gamma$  y mouse IL-2, de R&D Systems con todas sus especificaciones.

## RESULTADOS

Con el propósito de fusionar el gen E7 por su extremo 5' con los primeros 154 pb de la señal de secreción de la proteína Usp45 de *Lactococcus lactis*, y por su extremo 3' con un segmento de 570 pb de la proteína M6 de *Streptococcus pyogenes*, correspondiente a la señal de anclaje a pared celular, se diseñó un par de oligonucleótidos en los cuales se agregaron dos sitios de restricción *SalI* y *EcoRV* para facilitar el proceso de clonación. Además fue necesario modificar el codón de paro y el de inicio de la traducción del gen E7 como se indica en la Tabla 6, para lograr fusionar en fase de lectura todo el gen E7.

**Tabla 6. Representación de las secuencias de los genes E7, M6 y Usp45.**

E7	5'-ATGCATGGA.....CCA-3'
Usp45	5'-AAACAAGATGCGGTCGAC-3'
M6	5'-GAGATATCGCTAGCTTTAGAA.....-3'
Usp45-E7-M6	5'-CAAGATGCGGTCGACCATGGA.....CCAGAGATATCGCTAGCT...-3'

Los sitios de restricción *SalI* y *EcoRV* se encuentran subrayados.

Secuencia del gen E7 (Gene Bank, gi|4927719:562-858):

ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTAT  
GAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCC  
CATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGAC  
ATTCGTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA

Secuencia del gen M6 (Gene Bank, gi|153699|gb|M11338.); la secuencia incluida en el vector pVE5547 se encuentra marcada:

GATCTAGAAGAGATTGAAAAACAGTATGATGTGATCGTGACAGATGTTATGGTAGGAAAAAGCGATGAGTTAGAA  
ATTTT TTTTCTACAAAATGATTCCAGAAGCGATTATTGACAAGCTCAATGTGTTTTTAAACATCAGCTTTGCA  
GACAGCTTGGCCACTAGAGCAAACCCATCCAAGAACCCCTTGGACTTTCATCGCAAAGAGCTTACCTTTACCCAC  
TCCCCCAACAACGTTTTGCACGCCCCCCCGCACGAAGTTAGACAGCCTAGCCGCAGAACTCAAAAACAGATT  
CATCATTAATAGCATTTAGGTCAAAAGTGGCAAAGCTAAAAAGCTGGTCTTTACCTTTTGGCTTTTATTATTT  
ACAATACAATTATTAGAGTTAAACCTGAAAATGAGGGTTTTTCTAAAAATGATAACATAAGGAGCATAAAAA  
TGGCTAAAAATAACACGAATAGACACTATTCGCTTAGAAAATAAAAAAGGTAAGTGCATCAGTAGCAGTGGCTT

TGAGTGTAAATAGGGGCAGGATTAGTTGTCAATACTAATGAAGTTAGTGCAAGAGTGTTCCTAGGGGGACGGTAG  
 AAAACCCGGACAAAGCACGAGAACTTCTTAACAAGTATGACGTAGAGAACTCTATGTTACAAGCTAATAATGACA  
 AGTTAACAACCTGAGAATAATAACTTAACAGATCAGAATAAAAACCTTAACAACCTGAGAATAAAAACCTTAACAGATC  
 AGAATAAAAACCTTAACAACCTGAGAATAAAAACCTTAACAGATCAGAATAAAAACCTTAACAACCTGAGAATAAGGAGT  
 TAAAAGCTGAGGAGAATAGGTTAACAACCTGAGAATAAAGGGTTAACTAAAAAGTTGAGTGAAGCTGAAGAAGAAG  
 CAGCAAATAAAGAGCGAGAAAATAAAGAAGCCATTGGTACCCTTAAAAAACCTTGGATGAGACAGTAAAAGATA  
 AAATTGCTAAGGAGCAAGAAAGTAAAGAAACCATTGGTACCCTTAAAAAACCTTGGATGAGACAGTAAAAGATA  
 AAATTGCTAAGGAGCAAGAAAGTAAAGAAACCATTGGTACCCTTAAAAAACCTTGGATGAGACAGTAAAAGATA  
 AAATTGCTAAGGAGCAAGAAAGTAAAGAAACCATTGGTACCCTTAAAAAATCTTGGATGAGACAGTAAAAGATA  
 AAATTGCGAGAGAGCAAAAAAGTAAACAAGACATTGGTGCCCTTAAACAAGAATTAGCTAAAAAAGATGAAGGAA  
 ACAAGTTTCAGAAGCAAGCCGTAAGGGTCTTCGCCGTGACTTGGACGCATCACGTGAAGCTAAGAAACAGGTTG  
 AAAAAGATTTAGCAAACCTTGACTGCTGAACCTTGATAAGGTTAAAGAAGAAAAACAATCTCAGACGCAAGCCGTC  
 AAGGTCTTCGCCGTGACTTGGACGCATCACGTGAAGCTAAGAAACAAGTTGAAAAAGCTTTAGAGAAGCAAACA  
 GCAAATTAGCTGCTCTTGAAAACTTAACAAGAGCTTGAAGAAAGCAAGAAATTAACAGAAAAAGAAAAAGCTG  
 AGCTACAAGCAAAACCTTGAAGCAGAAGCAAAAGCACTCAAGAACAATTAGCGAAACAAGCTGAAGAAGCTTGCAA  
 AACTAAGAGCTGGAAAAGCATCAGACTCACAAACCCCTGATGCAAAACCCAGGAAACAAGTTGTTCCAGGTAAG  
 GTCAAGCACCACAAGCAGGTACAAAACCTAACCAAAACAAGCACCATGAAGGAAACTAAGAGACAGTTACCAT  
 CAACAGGTGAAACAGCTAACCCATTCTTCACAGCGGCAGCCCTTACTGTTATGGCAACAGCTGGAGTAGCAGCAG  
 TTGTA AACCGCAAAGAAGAAAACCTAAGCTATCACTTTGTAATACTGAGTGAACATCAAGAGAGAACCAGTCCGTT  
 CTCTCTTTTATGTATAGAAGAAATGAGATTAAAGGAGTCAAACTAACAACCTCTTAAAAAGCTGACCTTTACTA  
 ATAATCGTCTTTTTTTTATAATAAAGATGTTAATAATATAATTGATAAATGAGATACATTTAATGATTATGACAA  
 AAGCAAGAAAA

Secuencia de la proteína de secreción Usp45 (Gene Bank, gi|149524|gb|M60178.1); la  
 secuencia señal incluida en el vector pVE5547 se encuentra marcada:

GTGTTTTGTAATCATAAAGAAATATTAAGGTGGGGTAGGAATAGTATAATATGTTTATTCACCCGAACCTTAATGG  
 GAGGAAAAATTA AAAAAGAACAGTTATGAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAAATGTCTACAGTGATACTTTC  
 TGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACGCTGACACAACCTCAGATATTGCTAAACAAGATGCGACAATTTCAAG  
 CGCGCAATCTGCTAAAGCACAAAGCACAAAGCACAAGTTGATAGCTTGCAATCAAAGTTGACAGCTTACAACAAAA  
 GCAAACAAGTACTAAAGCACAAATCGCTAAAAATCGAAAGCGAAGTGAAGCACTTAATGCTCAAATTGCTACTTT  
 GAACGAAAGTATCAAAGAAGTACAAAGACATTGGAAGCTCAAGCAGTAGTGCTCAAGTTAACAGCTCAGCAAC  
 AAATTATATGGATGCTGTTGTTAATTCAAAATCTTTGACAGATGTTATTCAAAGTAACAGCTATTGCTACTGT  
 TTCTAGTGCCAAACAAACAAATCTTGGAACAACAAGAAAAAGAGCAAAAAGAGCTTAGCCAAAAGTCAGAACTGT  
 TAAAAAGAACTACAACCAGTTTCGTTTCTCTTTTACAAAGTTTGGATTCTCAAGCTCAAGAATTGACTTCACAACA  
 AGCTGAACTCAAAGTTGCGACTTTGAACTATCAAGCAACAATTGCAACTGCGCAAGATAAAAAACAAGCTTTATT  
 AGATGAAAAAGCAGCTGCAGAAAAAGCAGCTCAAGAAGCAGCTAAAAACAAGCGGCTTATGAAGCTCAACAAAA  
 AGAAGCAGCACAAGCACAAGCAGCTTCAACAGCAGCAACTGCTAAAGCTGTAGAAGCAGCAACTTCATCAGCTTC  
 TGCTTCATCTAGTCAAGCTCCACAAGTAAGTACAAGCACTGATAATACAACATCAAATGCTAGTGCCTCAAACAG  
 TTCTAATAGTTTATCAAACCTCAAGTTCAAGTTCTAGCAGTTTATCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGTAATTCTAA

TGCTGGTGGGAATACAAATTCAGGCACTAGTACTGGAAATACTGGAGGAACAACACTACTGGTGGTAGCGGTATAAA  
TAGTTCACCAATTGGAAATCCTTATGCTGGTGGTGGATGTACTGACTATGTATGGCAATACTTTGCTGCACAAGG  
AATTTATATCAGAAATATCATGCCTGGTAATGGTGGACAATGGGCTTCTAATGGACCTGCCAAGGCGTGCTCCA  
TGTTGTAGGAGCTGCTCCTGGTGTATCGCATCAAGCTTCTCAGCTGATTTTGTGGATATGCAAACCTCACCTTA  
CGGTACAGTAGCTATTGTAAAATCAGTTAATTCAGATGGTACAATTACTATCAAAGAAGGCGGATATGGTACAAC  
TTGGTGGGGACATGAACGTACTGTAAGTGCCTGCTGGTGTACTTTCTTGATGCCAAACTAGAAAAAGTCTTAAT  
AAATAAAAAATAGTGGTTTGATAGTGGGGAATAATTTTCCTTCTGTCAAATCATTTTTTATTATTGTGGTATAAT  
AATAAGGAAAAATGATA

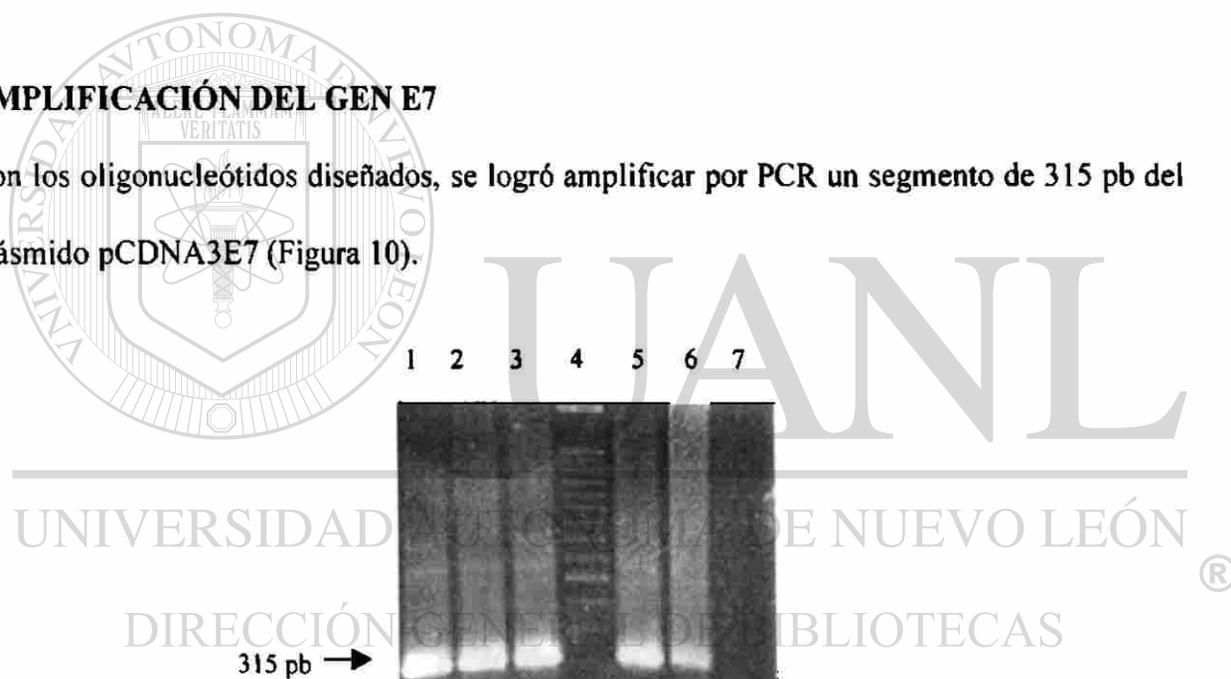
### Oligonucleótidos diseñados:

E7/SalI 5'-AGTCGACCCATTGCATGGAGATACACCTACATTG-3'

E7/EcoRV 5'-CGATATCTCTGGTTTCTGAGAACAGATGGGGCA-3'

### AMPLIFICACIÓN DEL GEN E7

Con los oligonucleótidos diseñados, se logró amplificar por PCR un segmento de 315 pb del plásmido pCDNA3E7 (Figura 10).



**Figura. 10. Amplificación del gen E7.** Se obtuvo por PCR el gen E7 a partir del plásmido pCDNA3E7 y se analizó en gel de agarosa 1%. Carriles 1-3, 5 y 6 plásmido pCDNA3E7; carril 4, Marcador de peso molecular 1 Kb, carril 7, control negativo.

### CLONACIÓN EN pGEM T®

La banda correspondiente al gen E7 se separó y purificó por el sistema Gene Clean II. Posteriormente se realizó una ligación con el pGEMT (Figura 11), el DNA plasmídico de las

clonas seleccionadas se digirió con *SaI*I y *EcoRV* para comprobar la presencia del inserto (Figura 12).

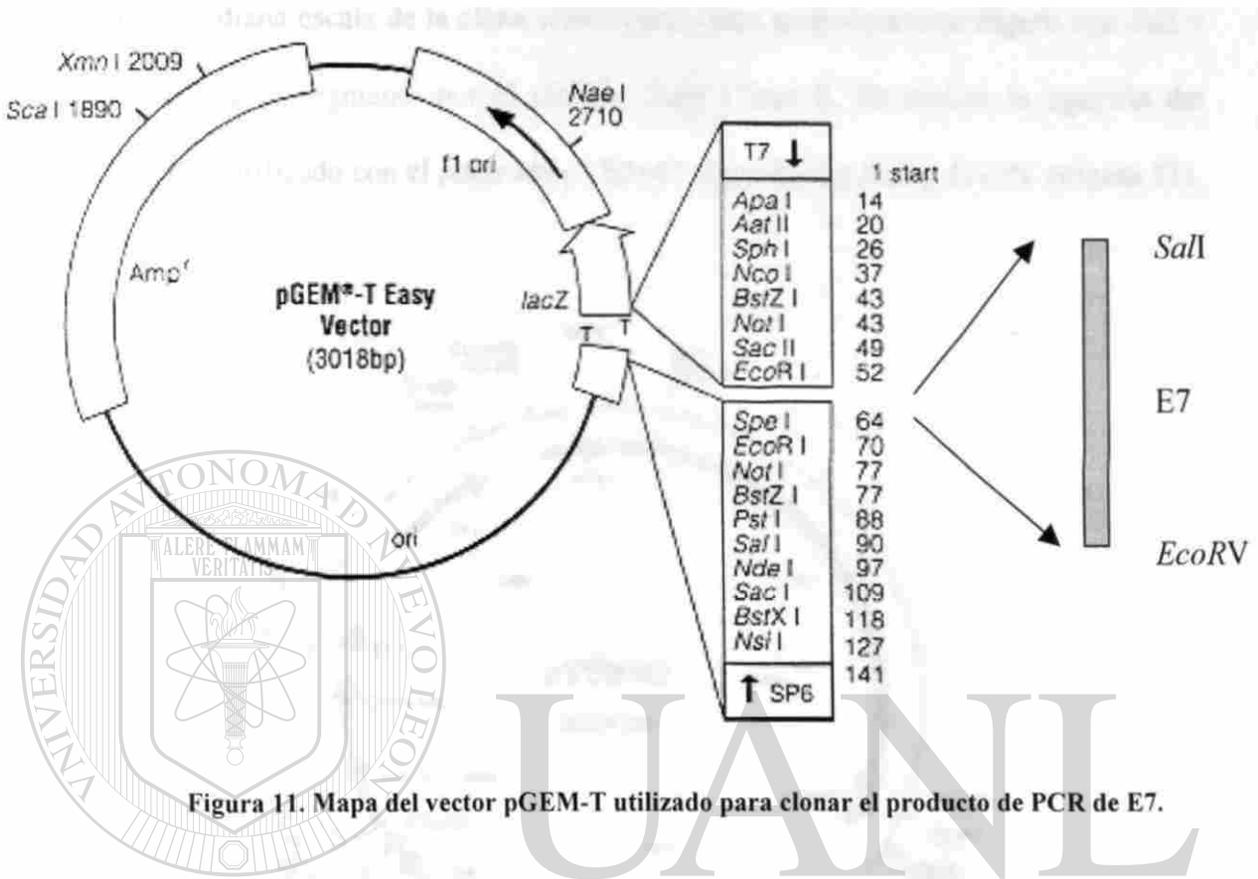


Figura 11. Mapa del vector pGEM-T utilizado para clonar el producto de PCR de E7.

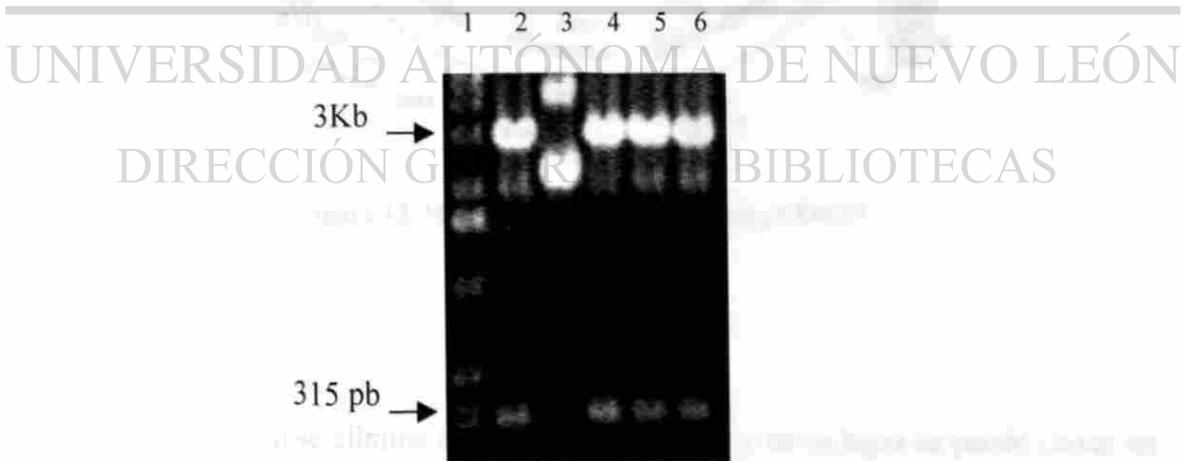
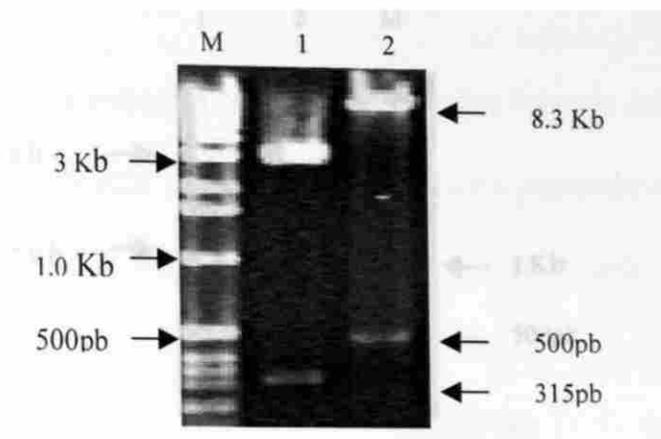


Figura 12. Caracterización de clonas recombinantes pGEMT-E7. Análisis de restricción de las clonas producto de la ligación pGEMT-E7. Carril 1, Marcador de peso molecular 1 Kb; carriles, 2, 4-6, clonas con inserto E7; carril 3, clona sin inserto.





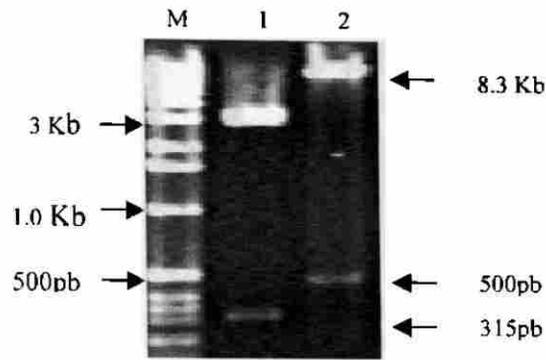
**Figura 14. Caracterización de los plásmidos usados.** Análisis de restricción de los vectores pGEMT-E7 y pVE5547. Carril 1, pGEMT-E7 digerido con *SalI/EcoRV*; carril 2, pVE5547 digerido con *SalI/EcoRV*; carril 3, Marcador de peso molecular 1 Kb.

Una vez clonado el gen E7 en el plásmido pVE5547, se realizó una digestión con *BglII* y *SpeI* para liberar el segmento de 1.2 Kb correspondiente a Usp45-E7-M6, el cual también se purificó por el sistema Gene Clean II, para ser ligado en el vector pVE3684-Trp previamente digerido con las mismas enzimas, de esta manera el segmento Usp45-E7-M6 quedó bajo la regulación del promotor inducible  $P_{nisA}$  (Figura 15).



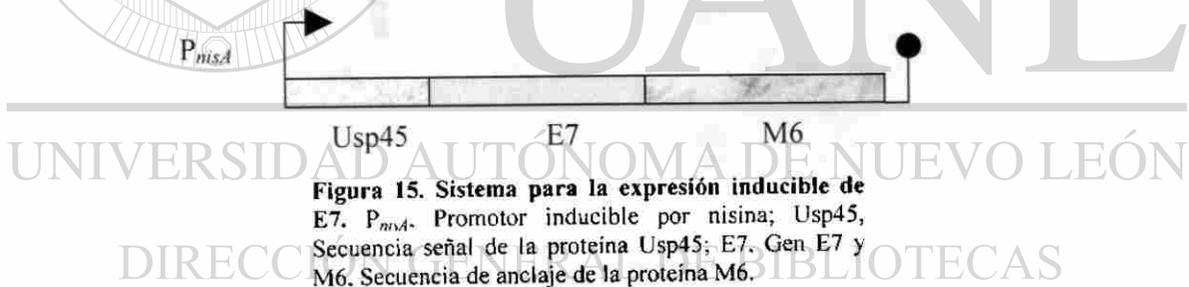
**Figura 15. Sistema para la expresión inducible de E7.**  $P_{nisA}$ , Promotor inducible por nisina; Usp45, Secuencia señal de la proteína Usp45; E7, Gen E7 y M6, Secuencia de anclaje de la proteína M6.

Una vez comprobada la clonación del segmento Usp45-E7-M6 dentro del vector pVE3684-Trp, mediante la digestión con *BglII* y *SpeI* (Figura 16), el plásmido recombinante se caracterizó por secuenciación (Figura 17).



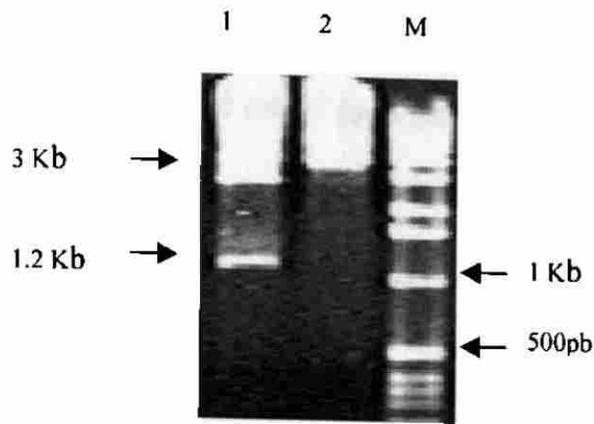
**Figura 14. Caracterización de los plásmidos usados.** Análisis de restricción de los vectores pGEMT-E7 y pVE5547. Carril 1, pGEMT-E7 digerido con *SalI/EcoRV*; carril 2, pVE5547 digerido con *SalI/EcoRV*; carril 3, Marcador de peso molecular 1 Kb.

Una vez clonado el gen E7 en el plásmido pVE5547, se realizó una digestión con *BglII* y *SpeI* para liberar el segmento de 1.2 Kb correspondiente a Usp45-E7-M6, el cual también se purificó por el sistema Gene Clean II, para ser ligado en el vector pVE3684-Trp previamente digerido con las mismas enzimas, de esta manera el segmento Usp45-E7-M6 quedó bajo la regulación del promotor inducible  $P_{nisA}$  (Figura 15).

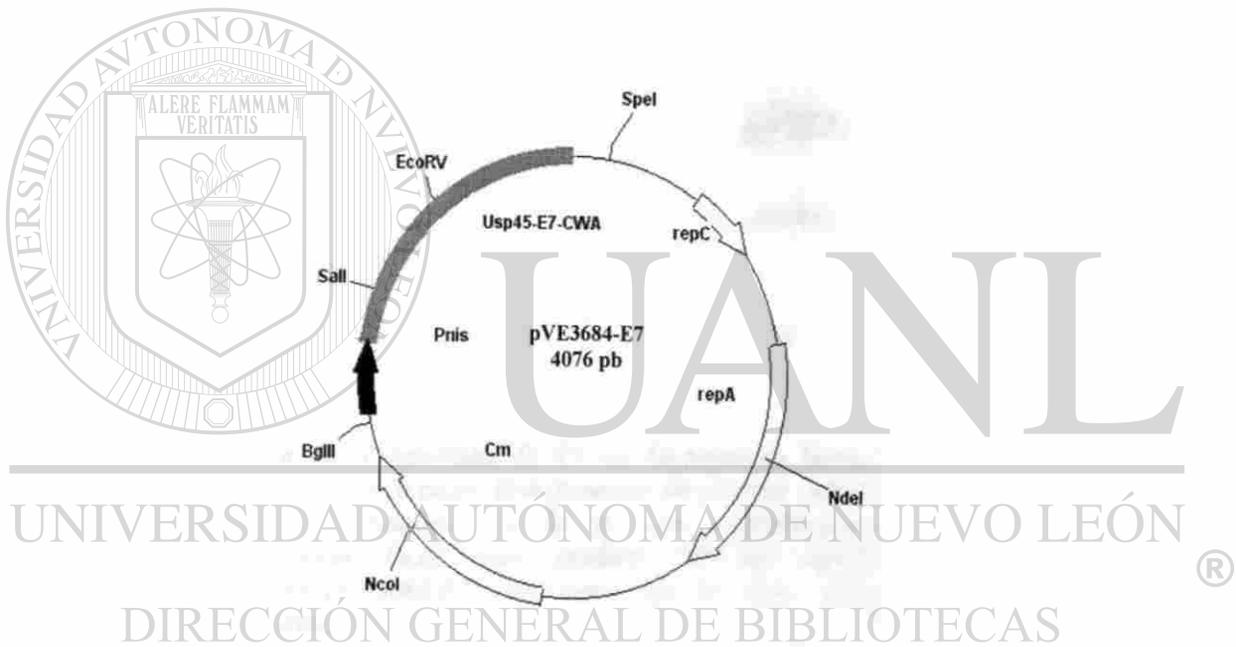


**Figura 15. Sistema para la expresión inducible de E7.**  $P_{nisA}$ . Promotor inducible por nisina; Usp45, Secuencia señal de la proteína Usp45; E7, Gen E7 y M6. Secuencia de anclaje de la proteína M6.

Una vez comprobada la clonación del segmento Usp45-E7-M6 dentro del vector pVE3684-Trp, mediante la digestión con *BglII* y *SpeI* (Figura 16), el plásmido recombinante se caracterizó por secuenciación (Figura 17).



**Figura 16. Caracterización del vector recombinante pVE3684-E7.** Análisis de restricción del plásmido pVE3684-E7. Carril 1, pVE3684-E7 dig. *Bgl*II/*Spe*I; carril 2, pVE3684-E7 no digerido. M, Marcador de peso molecular 1 Kb.

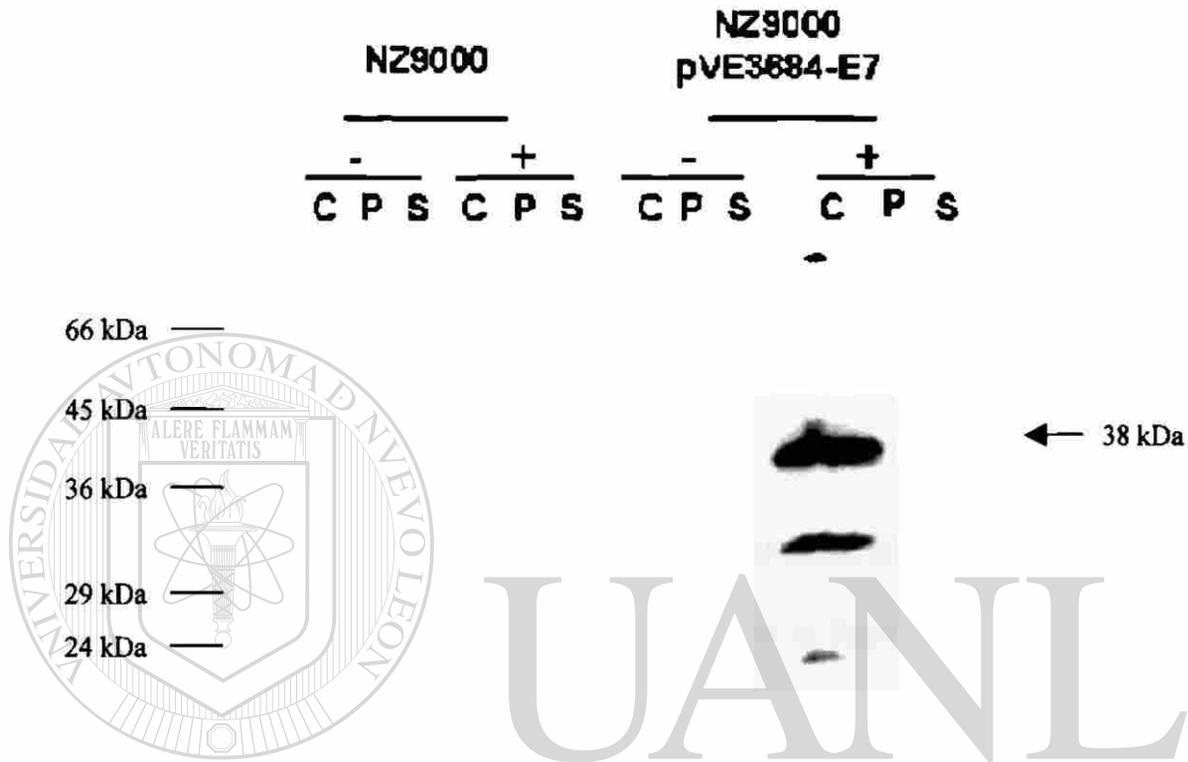


**Figura 17. Mapa del vector recombinante para la expresión de E7 en superficie de *Lactococcus lactis*.**

### ***Lactococcus lactis* ES CAPAZ DE EXPRESAR LA PROTEÍNA E7**

La expresión de la proteína E7 se comprobó mediante un ensayo de tipo Western blot con los extractos proteicos de la cepa construida (Figura 18). La proteína E7 fue localizada solo en la fracción citoplásmica de la bacteria recombinante, en donde se pueden observar 3 bandas bien definidas correspondientes a los 3 estados de la proteína. La banda mayor de aproximadamente 38 kDa corresponde al pro-péptido Usp45-E7-CWA, la segunda banda de

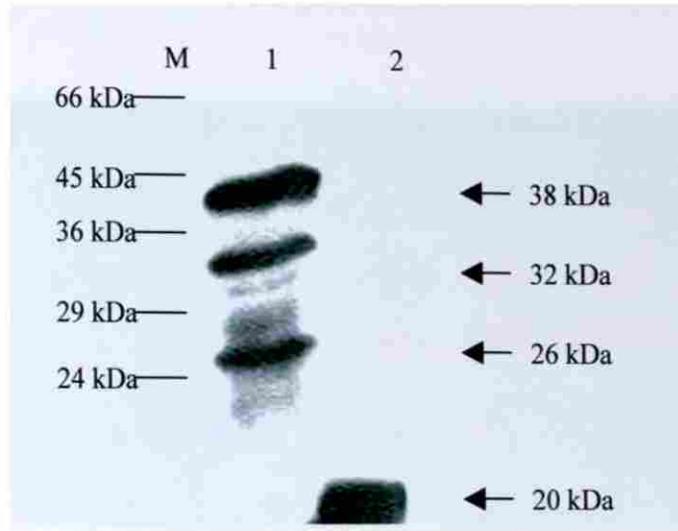
aproximadamente 32 kDa representa el estado de la proteína después del corte de la Usp45, (E7-CWA), la banda más pequeña (26 kDa) tiene el tamaño esperado para la proteína E7-CWA/ después del corte por la sortasa (Figura 19) lo que permitiría la unión a la pared celular (Figura 8 y Figura 9).



**Figura 18. Producción de E7 en *Lactococcus lactis*.** Se analizaron por Western Blot muestras de cultivos inducidos (+) y no inducidos (-) de la cepa recombinante de *Lactococcus lactis* para producir E7 en superficie (NZ9000/pVE3684-E7) así como de la cepa silvestre (NZ9000).

#### CUANTIFICACION DE LA PRODUCCION DE E7 POR *Lactococcus lactis*

Para determinar la cantidad de producción de la proteína E7 por la cepa recombinante construida (NZ9000/pVE3684-E7) se realizó un ensayo de comparación por densitometría con la cepa de referencia pSEC (Figura 19) la cual tiene una producción de ~5 mg/L. Con este procedimiento se logró determinar que la producción de E7 por la cepa NZ9000/pVE3684-E7 es de ~7.6 mg/L.

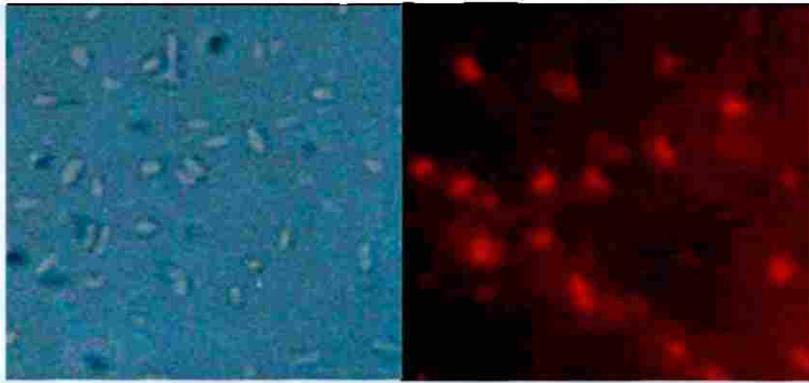


**Figura. 19. Cuantificación de E7 mediante Western blot.** Carril 1, fracción citoplásmica de la cepa productora de E7 (NZ9000/pVE3684-E7); carril 2, fracción sobrenadante de una cepa de referencia productora de E7 (pSEC). M, Marcador de peso molecular.

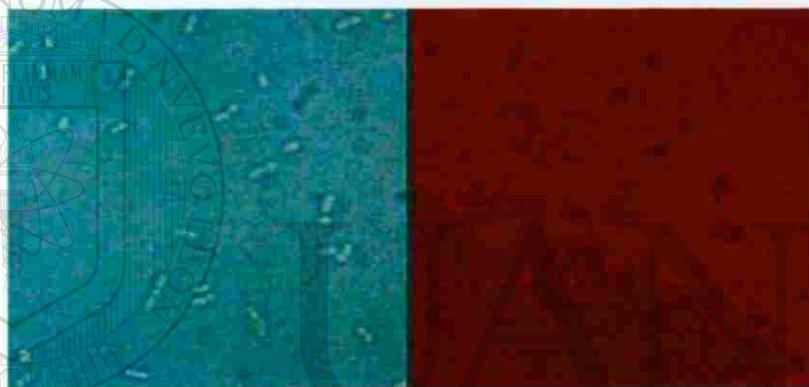
### **EXPRESION DE LA PROTEINA E7 EN LA SUPERFICIE DE *Lactococcus lactis***

Debido a que no fue posible localizar la proteína E7 en la fracción correspondiente a la pared celular, se utilizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta en la cual el primer anticuerpo fue dirigido contra la proteína E7 (ED17) y como segundo anticuerpo el anti-IgG de ratón (Alexa-Fluor). Los resultados se presentan en la Figura 20. Análisis por microscopía confocal revelan que las células que fueron incubadas con el anti-E7 y el segundo anticuerpo marcado emiten una clara señal de fluorescencia (Figura 20A), mientras que aquellas que fueron incubadas solo con el segundo anticuerpo no presentaron señal, indicando que efectivamente se están marcando aquellas células que tiene el anti-E7 unido a su superficie (Figura 20B). Como control negativo se incluyó una cepa silvestre de *Lactococcus lactis* (Figura 20C).

(A)



(B)



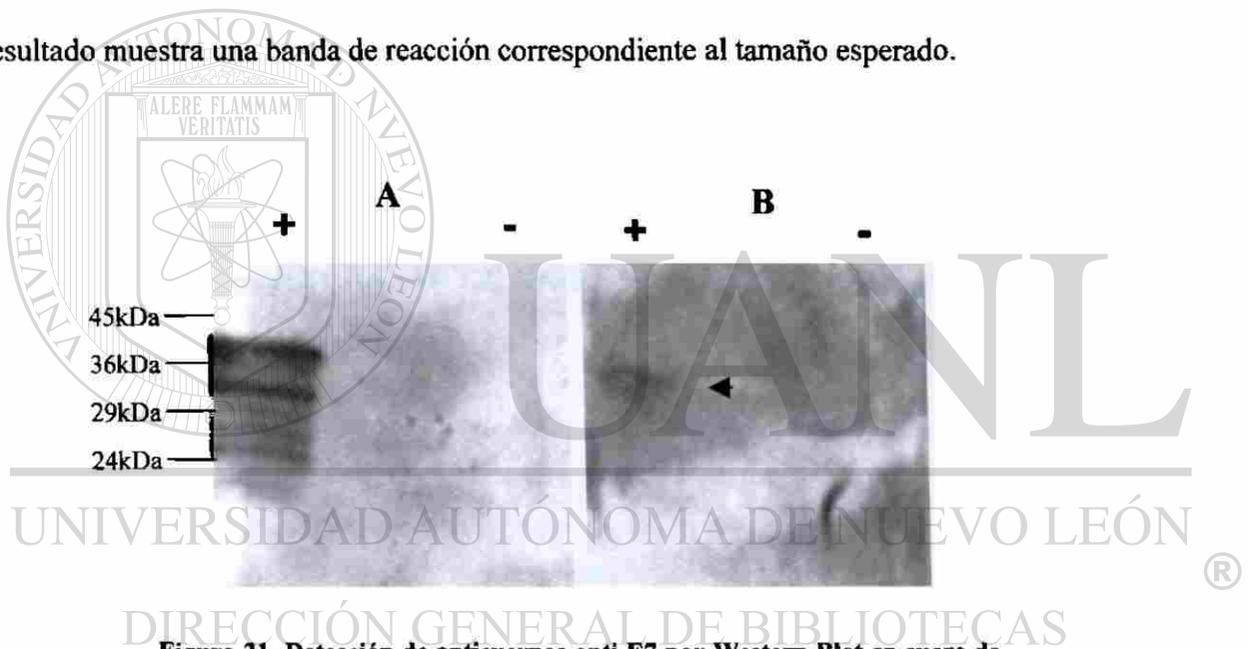
(C)



**Figura 20. Detección de E7 en la superficie de *Lactococcus lactis* por inmunofluorescencia.** Panel derecho: micrografías de inmunofluorescencia de la cepa recombinante de *Lactococcus lactis* tratadas con anti-E7 y anti-IgG Alexa Fluor (A); cepa recombinante tratada únicamente con el anti-IgG Alexa Fluor (B) y cepa silvestre de *Lactococcus lactis* tratada con anti-E7 y anti-IgG Alexa Fluor (C). Panel izquierdo: micrografías en campo claro. Magnificación 100X.

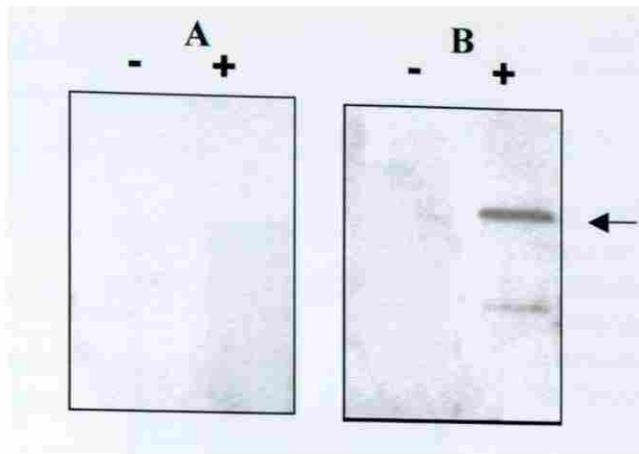
## LA BACTERIA RECOMBINANTE CONSTRUIDA ES CAPAZ DE INDUCIR LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS

Cuando se logró comprobar la presencia de la proteína E7 sobre la superficie de *Lactococcus lactis* se inmunizaron grupos de 5 ratones intranasalmente a tres dosis con  $1 \times 10^9$  células. Siete días después de la última inmunización se obtuvo sangre por vía retroorbital, de donde se aisló el suero para realizar los ensayos de determinación de anticuerpos contra E7. Primero se ensayó contra la fracción citoplásmica de la cepa expresando E7 (NZ9000/pVE3684-E7) y de la cepa silvestre (NZ9000) (Figura 21). Este resultado muestra una banda de reacción correspondiente al tamaño esperado.



**Figura 21. Detección de anticuerpos anti-E7 por Western Blot en suero de ratones inmunizados con *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie. A, Anticuerpo ED17. B, Suero de ratones inmunizados. (+) Fracción citoplásmica de una cepa de *Lactococcus lactis* expresando E7 (NZ9000/pVE3684-E7); (-) Fracción citoplásmica de una cepa silvestre NZ9000.**

Como medida confirmatoria, se realizó un segundo Western Blot utilizando extractos totales de la cepa BL21 productora de una proteína de fusión GST:E7. En la Figura 22 se logra observar la reacción de los anticuerpos contra E7 presentes en el suero de los ratones inmunizados con la cepa productora.

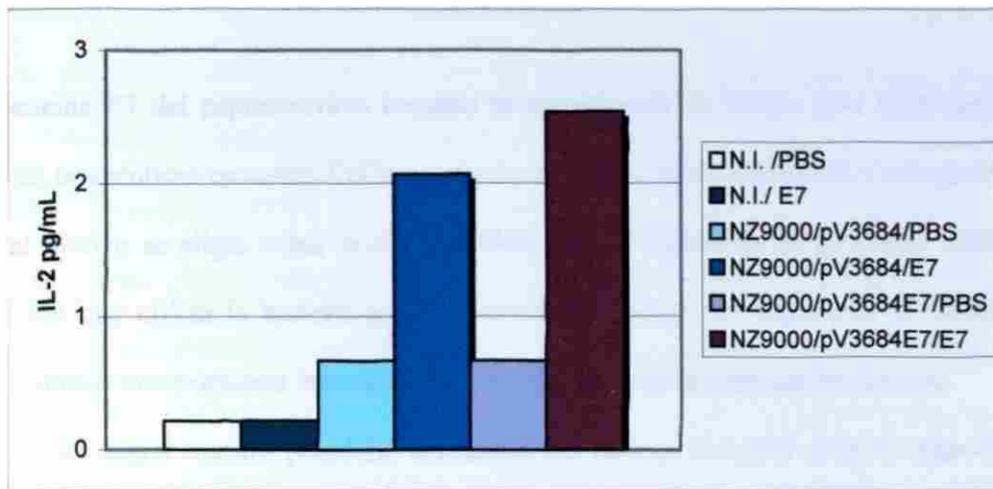


**Figura 22. Detección de anticuerpos anti-E7 por Western Blot en suero de ratones inmunizados con *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie.** A, Suero de ratones inmunizados con la cepa control (NZ9000/pVE3684). B, Suero de ratones inmunizados con la cepa productora de E7 (NZ9000/pVE3684-E7). (+) Extracto proteico de una cepa de *Escherichia coli* sobreproductora de E7 (BL21/GST:E7); (-) Extracto proteico de una cepa control (BL21/GST).

## LA ADMINISTRACIÓN NASAL DE LA BACTERIA RECOMBINANTE INDUCE LA PRODUCCIÓN DE INF- $\gamma$

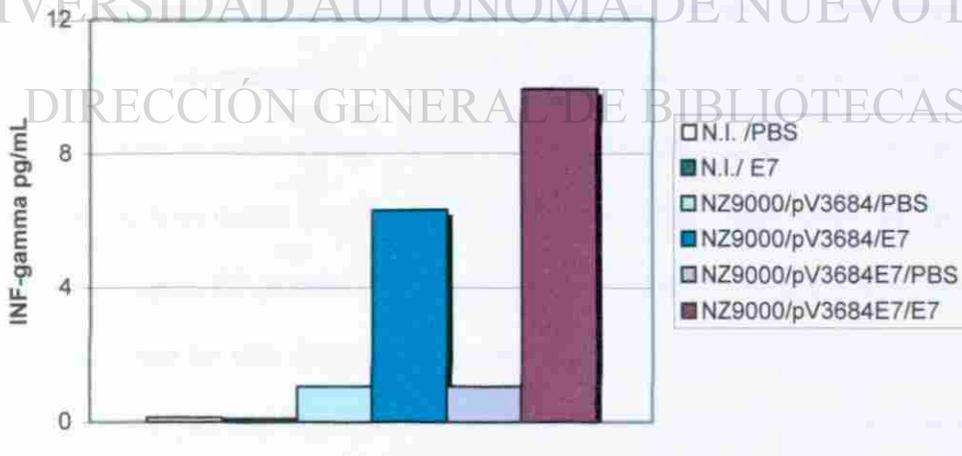
Con el objetivo de determinar el efecto de la administración de la cepa productora de E7 (NZ9000/pVE3684-E7) sobre la respuesta inmune de tipo celular, se monitoreó la inducción de dos importantes citocinas relacionadas con este tipo de respuesta, las cuales son INF $\gamma$  e IL-2. Para este ensayo los ratones inmunizados fueron sacrificados a los 7 días después de la última inmunización, las células de bazo fueron cultivadas en presencia del péptido comercial de E7 RAHYNIVTF (SIGMA-GENOSYS), ó PBS como control, para posteriormente analizar la producción de las citocinas con un Kit comercial.

La gráfica de la Figura 23 muestra los resultados de la inducción de IL-2. No se observó una diferencia significativa entre la producción de IL-2 por células de bazo de ratones inmunizados con la cepa control y aquella que porta el plásmido con el gen E7.



**Figura 23. Inducción de IL-2 por *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie.** Células de bazo de ratones sin inmunizar (N.I), inmunizados con un *Lactococcus lactis* control (NZ9000/pV3684) y con el *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie (NZ9000/pV3684E7) fueron reestimuladas *in vitro* con solución salina (PBS) ó con un péptido sintético de E7 (E7).

Respecto a la inducción de INF- $\gamma$ , se observa un aumento considerable en la producción de esta citocina entre los ratones inmunizados con la cepa control y aquellos que fueron inmunizados con la cepa productora de E7 (Figura 24), lo cual indica que la cepa recombinante construida es capaz de inducir la producción de INF $\gamma$  cuando es administrada nasalmente.



**Figura 24. Inducción de INF- $\gamma$  por *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie.** Células de bazo de ratones sin inmunizar (N.I), inmunizados con un *Lactococcus lactis* control (NZ9000/pV3684) y con el *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie (NZ9000/pV3684E7) fueron reestimuladas *in vitro* con solución salina (PBS) ó con un péptido sintético de E7 (E7).

## DISCUSION

La proteína E7 del papilomavirus humano es considerada un blanco para el desarrollo de vacunas terapéuticas en contra CaCu, ya que es expresada por queratinocitos infectados [53], por tal motivo se eligió como la proteína ideal para el desarrollo de un nuevo sistema de expresión que utiliza la bacteria grado alimenticio *Lactococcus lactis* con la finalidad de lograr inducir una respuesta inmune cuando es administrada nasalmente en ratones.

Para lograr nuestro propósito diseñamos un sistema inducible para la expresión del antígeno E7 sobre la superficie de *Lactococcus lactis*, en el cual el gen E7 se fusionó en su extremo 5' con la señal de secreción de la proteína nativa de *Lactococcus lactis* Usp45, y por su extremo 3' con un segmento de la proteína M6 de *Streptococcus pyogenes* correspondiente a la señal de anclaje (LPXTGX). La eficiente producción de E7 por la bacteria recombinante construida se comprobó mediante Western Blot (Figura 18). La proteína E7 fue localizada sobre la superficie de la bacteria como se observa en la Figura 20, con lo cual se demuestra que el sistema funciona de la manera correcta.

— Para determinar si la bacteria recombinante construida era capaz de estimular la respuesta inmune después de ser administrada vía nasal en un modelo murino, nosotros nos enfocamos a medir primeramente la respuesta inmune humoral de tipo IgG en el suero de los ratones inmunizados, como se esperaba nuestra bacteria fue capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno E7, lo cual nos permite suponer que la bacteria es procesada y el antígeno E7 presente en su superficie es presentado al organismo de una forma inmunogénica, como ha sido demostrado en investigaciones anteriores con otras proteínas heterólogas [42, 44, 46, 50]. La respuesta inmune mediada por anticuerpos es considerada esencial cuando se trata de infecciones productivas, sin embargo hasta el momento no se conoce con exactitud el papel que podría desempeñar en NIC y el cáncer invasor, aunque se sugiere un potencial inmunogénico [34]; debido a lo anterior consideramos importante

evaluar también la capacidad de este modelo para inducir una respuesta inmune de tipo celular, con esta finalidad se realizó un ensayo de inducción de citocinas *in vitro* por medio del cual se midió la inducción de dos citocinas estrechamente relacionadas con la respuesta inmune celular, IL-2 e INF- $\gamma$ . La IL-2 es producida por células T activadas por antígeno, actúa estimulando la proliferación de linfocitos T, además de estimular las funciones efectoras de las células asesinas naturales (NK) y células B [80]; en el ensayo realizado en este trabajo, la producción de IL-2 por las células de bazo de los ratones inmunizados aparentemente no está involucrada con la administración de la bacteria diseñada, ya que no hay una diferencia significativa entre el modelo y el control (Figura 23). Un aspecto importante a considerar es que una forma de autorregulación de la respuesta inmune mediada por células T es por medio de la producción de IL-2, por lo cual una sobre-estimulación no resultaría satisfactorio para nuestros propósitos.

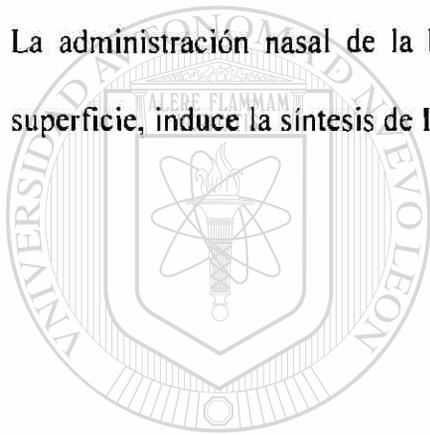
El INF- $\gamma$  es una citocina producida por linfocitos T y células asesinas naturales, su principal función es la activación de macrófagos en la respuesta inmune innata y adaptativa [80] su producción supone la presencia de LT activados, además sugiere la inducción de una respuesta inmune de tipo celular. Nuestros resultados indican que la bacteria recombinante es capaz de inducir la producción de INF- $\gamma$  cuando es administrada nasalmente en ratones (Figura 24). Estos datos nos llevan a proponer que el modelo diseñado es capaz de inducir una respuesta inmune de tipo humoral y que además podría ser capaz de despertar también una respuesta inmune de tipo celular.

## CONCLUSIONES

La proteína E7 del HPV-16 se expresa satisfactoriamente sobre la superficie de la bacteria probiótica *Lactococcus lactis*.

La bacteria *Lactococcus lactis* que expresa la proteína E7 del HPV-16 en su superficie es capaz de inducir la producción de anticuerpos de tipo IgG específicos contra el antígeno E7 cuando es administrada nasalmente en un modelo murino.

La administración nasal de la bacteria recombinante a ratones, que expresa E7 sobre su superficie, induce la síntesis de INF $\gamma$  en las células de bazo.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ANEXO

### Preparación de soluciones

#### Azul de Comassi

0.25 g de Azul de Comassi  
45 ml de agua  
45 ml de Metanol  
10 ml de ácido acético  
Filtrar para eliminar las partículas que no se disuelven. Almacenar a 4°C

#### Buffer de Lavado

Sucrosa 0.5M  
Glicerol 10%  
Esterilizar por autoclave  
Almacenar a 4°C

#### Buffer de Transferencia

Tris Base 50mM  
Glicina 380mM  
Metanol 20%  
SDS 0.01%  
Almacenar a temperatura ambiente

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

#### Buffer Tris-Glicina 5X

7.55g de Tris base  
47g de Glicina  
Disolver bien en 400ml de agua destilada  
Añadir 25ml de SDS 10%  
Ajustar el volumen a 500ml  
Almacenar a temperatura ambiente

### **Buffer Tris-HCl 1M pH 6.8**

Pesar 7.2g de Tris, disolver en un poco de agua ajustar el pH con HCl concentrado y completar el volumen a 60ml  
Esterilizar por autoclave  
Almacenar a temperatura ambiente

### **Buffer Tris-HCl 1.5M pH 8.8**

Pesar 10.89g de Tris disolver en un poco de agua, ajustar el pH con HCl concentrado y completar el volumen a 60ml.  
Esterilizar por autoclave  
Almacenar a temperatura ambiente

### **Cloranfenicol**

Pesar 0.01g de cloranfenicol (SIGMA), y disolver en 1ml de etanol al 100%  
Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **DTT 1M**

Pesar 0.1g de DTT  
Disolver en 1ml de agua  
Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **Eritomicina**

Pesar 0.01g de eritromicina (SIGMA), y disolver en 1ml de etanol al 100%  
Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **GM17SG**

M17 (DIFCO)  
Sucrosa 0.5M  
Glucosa 1%  
Glicina 2%

Preparar el GM17S, esterilizar por autoclave, por separado esterilizar un stock de Glicina al 20% esterilizar por autoclave.

### **IPTG 0.1M**

Pesar 0.024g de IPTG  
Disolver en 1ml de agua  
Esterilizar por filtración  
Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **LB Agar Ampicilina**

Pesar 6.4g de LB agar (GIBCO BLR)  
Agregar 200ml de agua destilada  
Esterilizar por autoclave  
Agregar ampicilina a una concentración final de 100mg/ml

### **Loading Buffer 2X**

Tris 130mM  
Ajustar a pH 6.8  
SDS 4%  
Glicerol 30%  
Azul de Bromofenol 0.2%  
DTT 200mM  
Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **PBS**

NaCl 136mM  
KCl 2.6mM  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12.1mM  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76mM  
Ajustar a pH7.4  
Esterilizar por autoclave  
Almacenar a temperatura ambiente

### **PMSF 100mM**

Pesar 0.0174g  
Disolver en 1ml de isopropanol  
Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **PSA 10%**

Pesar 0.1g de PSA y disolver en 1ml de agua estéril  
Almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$ , solo dura 1 semana en estas condiciones

## **SDS 10%**

Pesar 4g de SDS completar el volumen a 40ml  
Almacenar a temperatura ambiente

## **Solución Bloqueadora**

Leche descremada 10% en TBS-T

## **Solución Decolorante**

200ml de Metanol  
35ml de ácido acético  
265ml de agua destilada  
Almacenar a temperatura ambiente

## **Solución de Desarrollo**

Mezclar 200ml de solución de desarrollo (Kodak) con 800ml de agua  
Almacenar a temperatura ambiente  
Proteger de la luz

## **Solución diluyente de Anticuerpos**

Leche descremada al 2% en TBS-T

## **Solución Diluyente de Sustrato**

Dietanolamina 0.1M  
Ajustar a pH 9.5  
MgCl<sub>2</sub> 1mM  
Almacenar a temperatura ambiente

## **Solución Fijadora**

Disolver 200ml de la solución de Fijación (Kodak) en 1L de agua  
Almacenar a temperatura ambiente, proteger de la luz

### **Solución I para Minipreparaciones de Plásmido**

50mM Glucosa  
10mM EDTA  
25mM Tris-HCl  
Ajustar el pH a 8  
Almacenar a temperatura ambiente

### **Solución II para Minipreparaciones de Plásmido**

0.2 N NaOH  
1% SDS  
Almacenar a temperatura ambiente

### **Solución III para Minipreparaciones de Plásmido**

Acetato de potasio 3M pH 5.2  
3M Acetato de potasio  
Ajustar el pH con ácido acético glacial  
Almacenar a temperatura ambiente

### **Solución IL para Minipreparaciones de Plásmido (TES-LM)**

25% de Sacarosa  
1mM EDTA  
50mM Tris-HCl pH8.0  
Lisozima 10mg/ml  
Mutanolisina 1mg/ml  
Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **Solución IIL para Minipreparaciones de Plásmido**

0.2 N NaOH  
1% SDS  
Almacenar a temperatura ambiente

### **Solución IIIL para Minipreparaciones de Plásmido**

3M Acetato de potasio  
Ajustar el pH con ácido acético glacial  
Almacenar a temperatura ambiente

## **Solución IVL para Minipreparaciones de Plásmido**

Fenol: Cloroformo 1:1  
Almacenar a temperatura ambiente

## **SEVAGE**

Cloroformo- alcohol isoamílico (24:1)  
Almacenar a temperatura ambiente

## **SOC**

Peptona 2%  
Extracto de levadura 0.5%  
Cloruro de Sodio 10mM  
KCl 2.5mM  
Magnesio 20mM  
Glucosa 20mM

## **TBS Tween 10X**

Tris 200mM  
NaCl 1.37M  
Ajustar el pH a 7.5  
Tween 20 5%

Almacenar a temperatura ambiente

## **TCA 100%**

Disolver 10g de TCA en 4.5ml de agua  
Almacenar a 4°C

## **TE 1X**

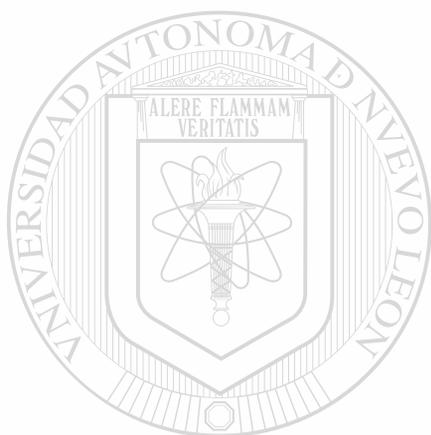
Tris-HCl 10mM  
EDTA 1mM  
Ajustar a pH 8  
Esterilizar por autoclave  
Almacenar a temperatura ambiente

## **TE-RNasa**

50mM Tris-HCl  
5mM EDTA pH7.5  
20µg/µL RNAsa  
Almacenar a -20°C

## **X-gal**

Disolver 50mg de X-gal en 1ml de NN dimetilformamida  
Almacenar a -20°C.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LITERATURA CITADA

- 1.- Muñoz N., Bosch FX. 1997 Cervical cáncer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Publica Mex.* 39:274-282.
- 2.- Escandón-Romero, Benitez-Martinez MG, Navarrete-Espinoza J, Vazquez M. JL, Martinez-Monteñes OG, Escobedo de la Peña J. 1992. Epidemiología del cáncer cervicouterino en el instituto mexicano del seguro social. *Salud Publica Mex.* 40:38-46
- 3.- Guzmán-Rojas L., Alcocer-Gonzalez JM., Madrid- Marina V.1998. Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra cáncer cervicouterino. *Salud Publica Mex.* 40:38-46.
- 4.- Hausen H.1996.Papillomavirus infection-a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288. F55-F78.
- 5.- Hausen H., Villiers EM. 1994. Human papillomavirus. *AR Microbiol* 48(1):427-447.
- 6.- Holly EA. 1996. Cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer, and hpv. *AR. Public Health* 17(1):69-84
- 7.-Brown DR., Schroeder JM., Bryan TJ. Stoler MH., Fife KH. 1999. Detection of multiple human papillomavirus types in condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients *J Clin Microbiol* 37(10):3316-3322.

8.- Tseng C., Pao CC., Lin J., Soong Y-K., Hong JH., Hsueh S. 1999. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical cancer patients and its association with prognosis. *J Clin Onco* 17(5):1391-1396.

9.- Meschede W., Zumbach K., Brespenning J., Scheffner M., Benitez- Bribiesca L., Luande J., Gissmann L., Pawlita M. 1998. Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 36(2):475-480.

10.-Hagensee ME. 1999.Humann papillomavirus vaccine. *Infect Urol* 12(1):11-15, 18-19

11.- Storey A. 1998. p53 allele predisposes to human papillomavirus-associated cancers. *Nature* 393:229-234

12.- Shi W., Bu P., Lui J., Polack A., Fisher S and Qiao L. 1999. Human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine : mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and antitumor activity. *J Virol* 73(9):7877-7881.

13.-Greenstone HL Nieland JD. Visser K.E., De Bruijn M.L.H. Kimbaver R., Roden R.B.S., Lowy D.R., Kast W.M. and Schiller J.T. 1998. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 Oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc.Natl.Acad.Sci* 95:1800-1805.

14.- Alvarez-Salas LM., Cullinan AE., Siwkowski A., Hampel A. and DiPaulo JA. 1998. Inhibition of HPV-16 E6/E7 immortalization of normal keratinocytes by hairpin ribozymes. Proc.Natl.Acad.Sci. 95:1189-1194

15.- Pahel G., Aulabaugh A., Short SA., Barnes JA., Painter GR., Ray P. and Phelps WC. 1993. Structural and functional characterization of the HPV16 E7 protein expressed in bacteria. J.Biol.Chem. 268(34)26018-26025

16.- Stöppler H., Hartmann DP., Sherman L. and Schlegel R. 1997. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length- J.Biol.Chem. 272(20):13332-13337.

17.- Pei XF. 1996 The human papillomavirus E6/E7 genes induce discordant changes in the expression of cell growth regulatory proteins. Carcinogenesis 17:1395-1401.

18.- Oda D., Bigler L., Mao ES. and Disteche CM. 1996. Chromosomal abnormalities in HPV-16-immortalized oral epithelial cells. Carcinogenesis 17:2003-2008.

19.- Berezuts Kaya E. and Bagchi S. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26s proteasoma- J.Biol.Chem. 272(48):30135-30140.

20.- Jeon S., Allen-hoffmann BL., and Lambert PF. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. J. Virol 69(5):2989-2997.

21.- Arbeit JM., Howley PM. and Hanahan D. 1996. Chronic strogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. Proc.Natl.Acad.Sci. 93:2930-2935.

22.- Nardelli-Haefliger D., Roden RBS., Benyacout J., Sahli R., Kraehenbuhl P., Schiller JT., Lachat P. Potts A., and Grandi P. 1997. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. Infect.Immun. 65(8):3328-3336

23.- Smotkin D., Wettstein F., The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. J.Virol 1987 61(5):1686-1689

24.- Bedell MA., Jones KH. and Laimins LA. 1987. The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and Rat-1 cells J.Virol.

1987 61(11):3635-3640

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

25.- Kanda T. Furuno A. and Yoshike K. 1988. Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. J.Virol. 62(2):610-613

26.- Dyson N., Howley PM., Münger K., Harlow ED. 1989. The human papillomavirus- 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science 243:934-937

27.- Stirdivant SM., Huber HE., Patrick DR., Defeo-Jones D., McAvoy EM., Garsky VM., Oliff A., and Heimbrook DV. 1992. Human papillomavirus type 16 E7 protein inhibits DNA binding by the retinoblastoma gene product. *Mol.Cell.Biol.* 12(5):1905-1914.

28.- McIntyre MC., Frattini MG., Grossman SR., and Laimins LA. 1993. Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact cys-x-y-cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J.Virol.* 67(6):3142-3150

29.- Gulliver GA. Herber RL., Liem A., and Lambert PF. 1997. Both conserved region CR1 and CR2 of the human papillomavirus type 16 E7 oncogene are required for induction of epidermal hyperplasia and tumor formation in transgenic mice. *J.Virol* 71(8):5905-5914

30.- Pouwels PH., Leer RJ., Shaw M., Heijne den Bak-Glashouwer MJ., Tielen FD., Smit E., Martinez B., Jore J., Conway PL. 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int. J. Food Microbiol.* 41(2):155-67

31.-Kowalczyk DW., Ertl HCJ. 1999. Immune responses to DNA vaccines. *Cell.Mol.Life.Sci.* 55:751-770

32.- Gariglio P., Beintez-Bribiesca L., Berumen J., Alcocer JM., Reyes T., and Madrid V. 1998. Therapeutic uterine-cervix cancer vaccine in humans. *Archives of Medical Research* 29(4):279-284

33.- Wheeler CM. 1997. Vacunas para prevenir el cáncer cervical. *Salud Publica Mex* 39:283-287.

34.- Berumen J., Villegas N. 1997 Vacunas terapeuticas recombinantes contra el cáncer del cuello uterino. Salud Publica Mex, 39:288-297

35.- Duggan-Keen MF., Brown MD., Stacey SN., and Stern PL. 1998 Papillomavirus vaccines. Frontiers in Bioscience 3:1192-1208

36.- Shu Q., Gill HS., Hennssy DW., Leng RA., Bird SH., Rowe JB. 1999 Immunisation against lactic acidosis in cattle. Res Vet Sci 67(1):65-71

37.- Holmgren J., Czerkinsky C., Lycke N., Svennerholm AM. 1992 Mucosal immunity: implications for vaccine development. Immunobiology 184(2-3):157-79

38.- Boyaka PN., Marinaro M., Vancott JL., Takahashi I., Fujihashi K., Yamamoto M., Van Ginkel FW., Jackson RJ., Kiyona H., McGhee JR. 1999. Strategies for mucosal vaccine development. Am J Trop med Hyg 60(4):35-45

39.- Rush CM., Hafner LM., Timms P. 1994. Genetic modification of a vaginal strain of *Lactobacillus fermentum* and its maintenance within the reproductive tract after intravaginal administration J Med Microbiol 41(4):272-8

40.- Holmgren J. 1991 Mucosal immunity and vaccination FEMS Microbiol Inmno 4(1):1-9

41.- Mestecky J. and Fultz PN. 1999. Mucosal immune system of the human genital tract J.Infect Dis 179:5470-5474

42.- Steidler L., Robinson K., Chamberlain L., Schofield K., Remaut K., Le Page RWF., and Wells JM. 1998 Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and (IL-6) by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect. Immun* 66(7):3183-3189.

43.-Robinson K., Chamberlain LM., Schofield KM., Wells JM., Le Page RW. 1997. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* 15(7):653-7

44.-Norton PM., Wells JM., Brown HW., Macpherson AM., Le Page RW.. 1997. Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* 15(6-7):616-9

45.-Norton PM., Brown HW., Wells JM., Macpherson AM., Wilson PW., Le Page RW. 1996  
Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 14(2-3):167-77

46.-Norton PM., Le Page RWF., Wells JM. 1995. Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system *Folia Microbiol (Praha)* 40(3):225-30

47.-Norton PM., Brown HW., Le Page RW. 1994. The immune response to *Lactococcus lactis*: implications for its use as a vaccine delivery vehicle. *FEMS Microbiol Lett* 15;120(3):249-56

49.-Iwaki M., Okahashi N., Takahashi I., Kanamoto T., Sugita-Konishi Y., Aibara K., Koga T. 1990. Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun* 58(9):2929-34

50.- Wells JM., Wilson PW., Norton PM., Gasson MJ., Le Page RW. 1993 *Lactococcus lactis*: high-level expression of tetanus toxin fragment C and protection against lethal challenge. *Mol Microbiol* 8(6):1155-62

51.- Hathaway L.J., Kraehenbuhl. 2000. The role of M cells in mucosal immunity. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 57:323-332

52.- Wu Tzyy-Choo. 1994. Immunology of the human papilloma virus in relation to cancer. *Current Opinion in Immunology.* 6: 746-754

53.- Man Stephen. 1998. Human cellular immune responses against human papillomaviruses in cervical neoplasia. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>

54.- Palker TJ, Monteiro JM, Martin MM, Kakareka C, Smith JF, Cook JC, Joyce JG, Jansen Ku. 2001. Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. *Vaccine.* 19 (27):3733-43

55.- National Institutes of Health (NHI), National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). 1998. Understanding Vaccines. NIH Publication No. 98-4219. US Department of Health Human Services, Bethesda, MD.

56.- NIAID Task Force on Immunology. 1998. Report of the NIAID Task Force on Immunology. US Department of Health Human Services, Bethesda, MD.

57.- Transgene S.A. 2000. [www.transgene.fr/us/tech0066.html](http://www.transgene.fr/us/tech0066.html)

58.- Pozzi G, Contorni M, Oggioni MR 1992. Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. Infect. Immun. 60:1902-1907.

59.- Hines, JF 1998. Prospect for human papillomavirus vaccine development: emerging HPV vaccine. Current Opinion in Obstetrics & Gynecology 10(1):15-19

60.- Lowy DR and Schiller JT. 1998. Papillomaviruses: prophylactic vaccine prospects. Biochimica et Biophysica Acta 1423:M1-M8.

61.- Schiller JT. 1999. Papillomavirus-like particle vaccine for cervical cancer. Molecular Medicine Today 5:209-215

62.- Coursaget, P. Muñoz N. 1999. Vaccination against infectious agents associated with human cancer. Cancer Surveys 33:355-381

63.-Kols A. Sherris J. 2000. HPV vaccines: promise and challenges. Path. [http://www.brown.edu/Courses/Bio\\_160/Projects1999/hpv/vacc.html](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects1999/hpv/vacc.html)

64.-Donnelly, JJ. 1996. Protection against papillomavirus with a polynucleotide vaccine. *Journal of Infectious Disease* 173: 314-320.

65.- Robinson, HL. 1997. The Scientific Future of DNA for Immunization. American Society for Microbiology, Washington, D.C. [www.asmsusa.org/acarc/aca1.html](http://www.asmsusa.org/acarc/aca1.html).

66.- Fischetti VA, Medaglini D, Pozzi G. 1996. Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery. *Current Opinion in Biotechnology* 7:659-666.

67.-Tacket CO, Hone DM, Curtiss R III, Kelly SM, Losonsky G, Guers L, Harris AM, Edelman R, Levine MM. 1992. Comparison of the safety and immunogenicity of  $\delta$ -*aroC*  $\delta$ -*aroD* and  $\delta$ -*cya*  $\delta$ -*crp* *Salmonella typhi* strain in adult volunteers. *Infect Immun.* 6:536-541

68.- Pozzi G, Wells JM. 1997. Gram positive bacteria. Vaccine vehicles for mucosal immunization. Springer- Verlag. Alemania. Pg's 180

69.- Gruzza M, Fons M, Ouriet MF. 1994. Study of gene transfer in vitro and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora. *Microb Releases.* 2:183-189

70.-Klijn N, Weerkamp AH, de Vos WM. 1995. Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 61:2771-2774

71.-Gilbert C, Robinson K, Le page WF, Wells JM. 2000. Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis*. *Infect. Immun.*68:3251-3260

72.-Lee MH, Roussel Y, Wilks M, Tabaqchali S. 2001. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine* 16,19(28-29):3927-35.

73.- Enouf V, Langella P, Commissaire J, Cohen J, Corthier G. 2001. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. *Appl Environ Microbiol.* 67(4) :1423-8

74.-Chatel JM, Langella P, Adel- Patient K, Commissaire J, Wal JM, Corthier G. 2001. Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(3):545-

51

75.-Bermúdez-Humarán LG, Langella P, Gruss A, Tamez-Guerra RS, Montes de Oca-Luna R and Le Loir Y. 2001. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* aceptado (Nov 2001)

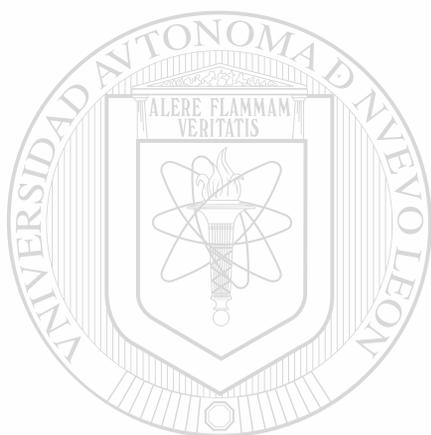
76.- Piard JC, Hautefort I, Fischetti AV, Erlich SD, Fons M, Gruss A. 1997. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 179(9):3068-3072

77.-Pancholi V, Fischetti VA. 1988. Isolation and characterization of the cell-associated region of the group A streptococcal M6 protein. *J Bacteriol.* 170:2618-2624.

78.-Schneewind O, Model P, Fischetti Va. 1992. Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. Cell 70:267-281.

79.-Tindle RW. 1996. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. Current Opinion in Immunology 8(6):643-650

80.-Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cellular and molecular immunology. Cuarta Edición. Saunders Company. USA. Pg's 553



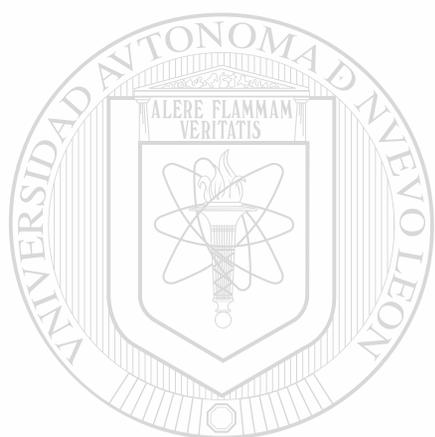
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

*Handwritten mark*



