

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

87



**“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**

2001

TM
RC280
.U8
C6
c.1

2001



1080117247

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

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



"EXPRESIÓN DE LA ONCOPROTEINA E7 DEL
PAPILOMAVIRUS HUMANO HPV-18 SOBRE LA
SUPERFICIE DE *Lactococcus lactis*, Y EVALUACIÓN
DE SU POTENCIAL INMUNOGENICO"

COMISIÓN DE TESIS

PRESENTA
QBP NAIMA GISELA CORTES PEREZ

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

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



1M
C280

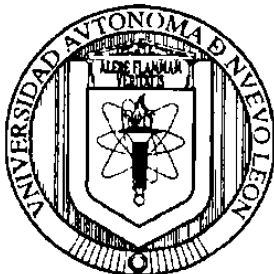
U8

C6

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”**

COMISION DE TESIS

Dr. Juan Manuel Alcocer González

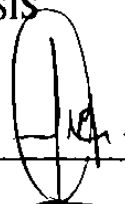
Presidente

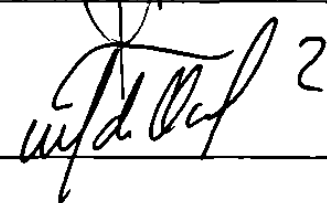
Dr. Roberto Montes de Oca Luna

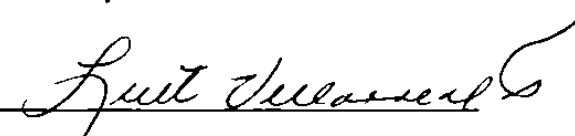
Secretario

Dra. Licet Villarreal Treviño

Vocal







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.

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

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.*

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 vehículos	32
<i>Lactococcus lactis</i> como modelo	33
Importancia	38
Hipótesis	38
Objetivo general	39
Objetivos Específicos	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_{nisA}	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- γ	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 le 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- γ 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

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 desoxirribonucléico
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	Proteína 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_{nisA}	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	Acido Tricloroacético
TTFC	Fragmento C de la toxina del tétanos
UreB	Subunidad B de la ureasa
VLP	Partículas tipo virales