

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- γ 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.

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.

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].

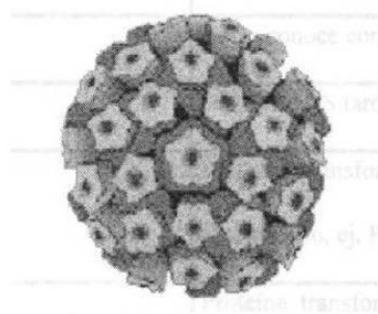


Figura 1. Virus del papiloma humano (HPV)

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 cápsida [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].

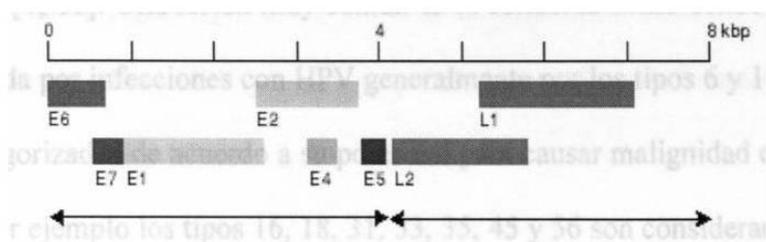


Figura 2. Organización génica del HPV

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].

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].

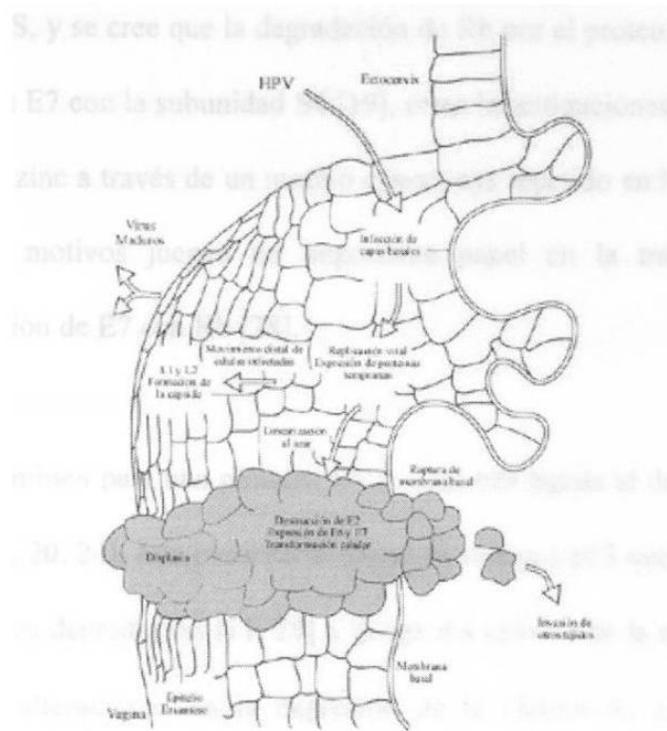


Figura 3. Infección por HPV y desarrollo de cáncer

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 immortalización 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].

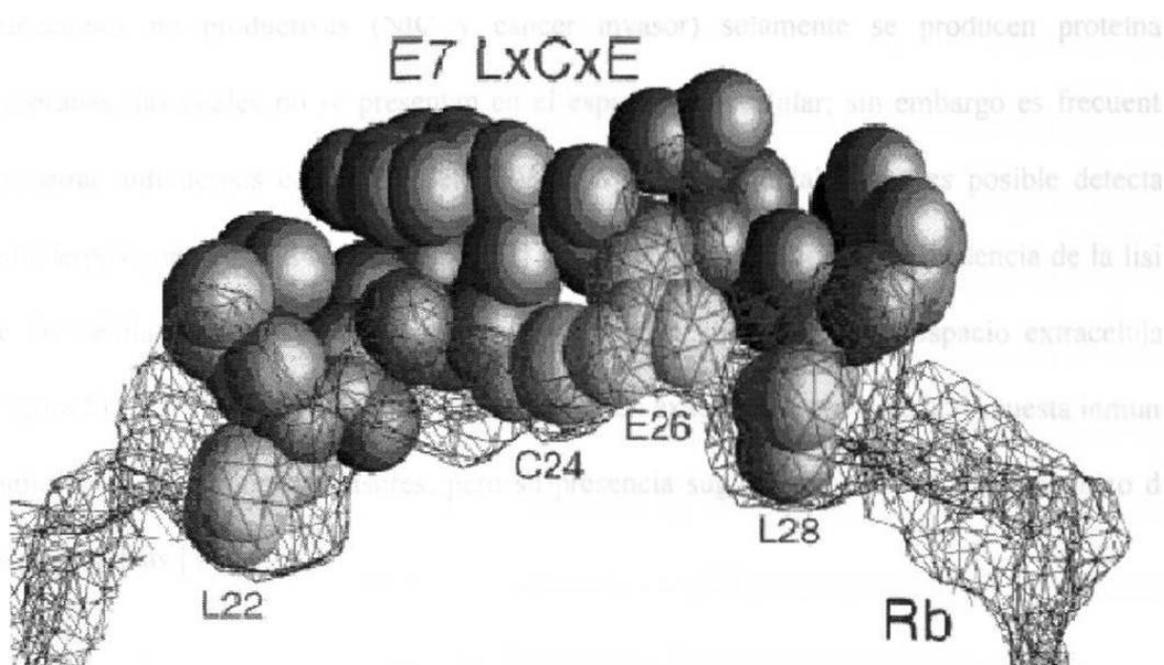


Figura 4. Interacción de la proteína E7 con Rb.

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]

1.5.1 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].

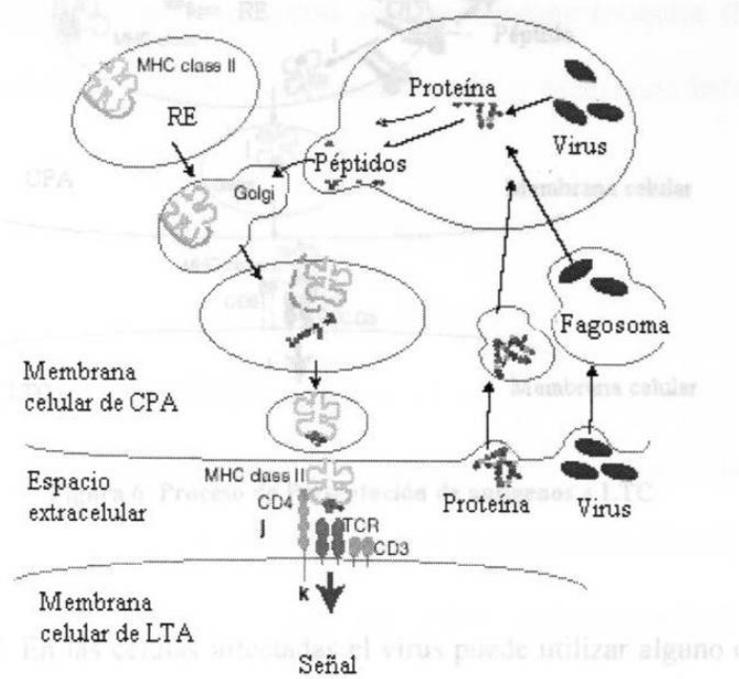


Figura 5. Presentación de antígenos a LTA

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].

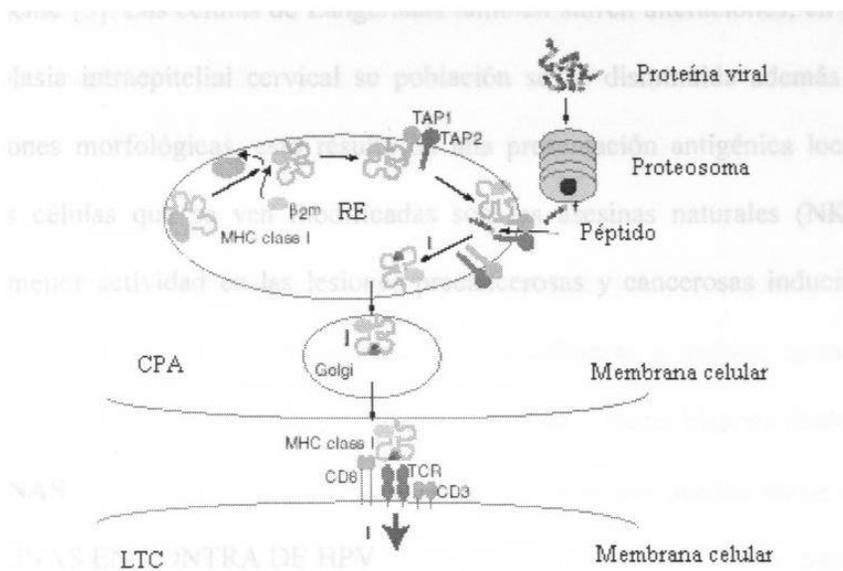


Figura 6. Proceso de Presentación de antígenos a LTC

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- β , 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 quimérico	Fase I II
Universidad de Queensland	HPV-16 L1,E7	VLP quimérico	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
InstitutoWistar	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
InstitutoWistar		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 L1, 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 protector 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].

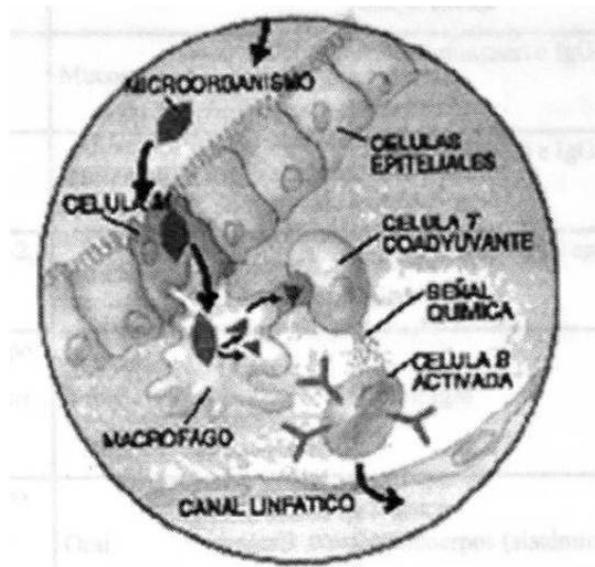


Figura 7. Representación del tráfico celular del sistema inmune mucosal.

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]

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 organismos 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].

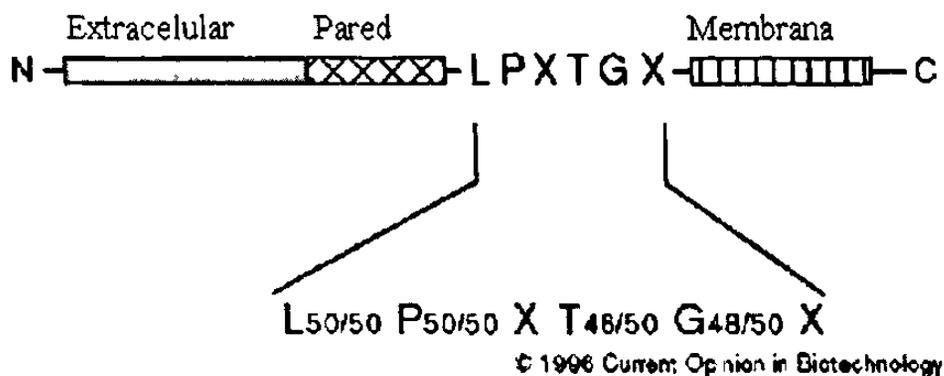


Figura 8. Hexapéptido altamente conservado en las proteínas de superficie de las bacterias Gram-positivas

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].

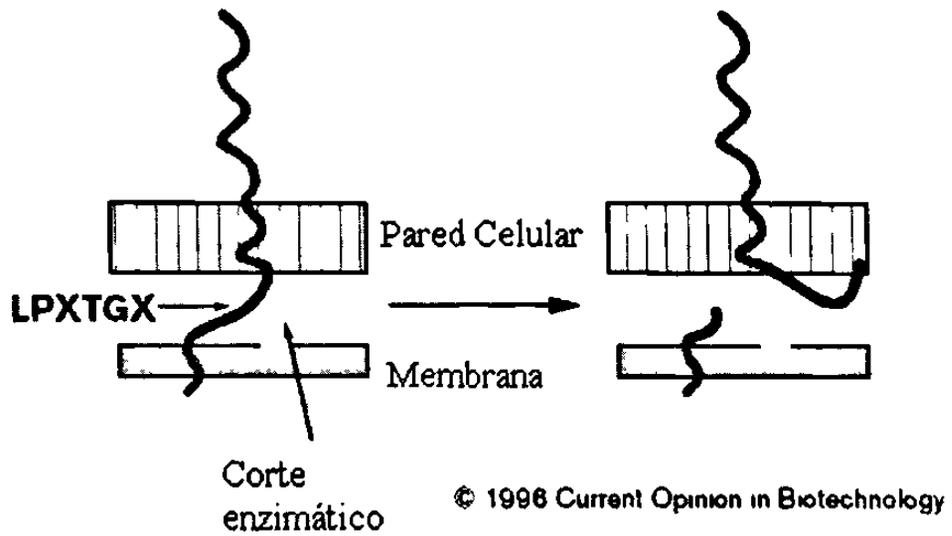


Figura 9. Mecanismo de anclaje en bacterias Gram-positivas

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.

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.

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- γ e IL-2.

MATERIAL

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas

<i>Escherichia coli</i>	Descripción	Referencia
JM109	F' 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' traD36lacI ^q Δ(lacZ) M15 proA ⁺ B ⁺ / supE Δ (hsdM- mcrB) 5 (r _k m _k McrB ⁻) 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 nis K</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 _{nisA} :NucA:CWA-long:pIL252	Colec.Recherches Laitières, INRA
PVE3684-Trp	pGK:P _{nisA} :SP:E7:Trp	[75]
pVE5547-E7	pBS:E7:CWA-long:pIL252	Este Trabajo
pVE3684-E7:	pGK:P _{nisA} :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

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

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_{nisA}). El fragmento liberado con *SalI* 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_{nisA}). La construcción obtenida se nombró pVE3684-E7.

Reacciones de Digestión

<i>pVE5547</i>	<i>5 µl</i>	<i>pGEM-E7</i>	<i>5 µl</i>
<i>SalI</i>	<i>1 µl</i>	<i>SalI</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 μ l	<i>pVE3684-Trp</i>	5 μ l
<i>BglIII</i>	1 μ l	<i>BglIII</i>	1 μ l
<i>SpeI</i>	1 μ l	<i>SpeI</i>	1 μ l
<i>Buffer H</i>	5 μ l	<i>Buffer H</i>	5 μ l
<i>Agua</i>	38 μ l	<i>Agua</i>	38 μ l
	<hr/>		<hr/>
	50 μ l		50 μ l

Reacciones de Ligación.

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

II. TRANSFORMACIÓN

II.1. *Escherichia coli*

II.1.1. Preparación de células Calcio-competentes. Se reactivó la cepa almacenada a -80° 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° C y 150 rpm. Con 1 ml de este cultivo, se inocularon 100 ml de caldo LB y se dejó en incubación a 37° C y 150 rpm hasta que alcanzó una 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° C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 10 ml de una solución fría de $CaCl_2$ 0.1 M, y se incubó durante 10 min a 4° C, posteriormente se centrifugó a iguales condiciones que el paso anterior, se eliminó el sobrenadante, se repitió el

lavado con la solución de CaCl_2 0.1 M, finalmente la pastilla se resuspendió en 0.5 ml de CaCl_2 0.1 M y 0.5 ml de glicerol al 50% ambas frías y estériles. Se hicieron alícuotas de 100 μl de bacterias e inmediatamente se almacenaron a -80°C .

II.1.2. Transformación. Se tomaron 50 μl de bacterias calcio competentes, se agregaron 5 μl de los productos de ligación (pGEM-E7) y se incubó en hielo durante 20 min, luego se aplicó un choque térmico a 42°C durante 50 segundos, inmediatamente después se colocó el tubo en hielo por 2 min, se agregaron 945 μl de medio SOC y se dejó en incubación a 37°C y 150 rpm durante 2 horas, posteriormente se centrifugó por 10 pulsos, para concentrar las células en aproximadamente 200 μl , se sembraron 100 μl 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°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°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°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°C en 5 ml de medio GM17 y se incubó toda la noche a 30°C . Se tomó 100 (2 ml) del cultivo anterior para inocular 222 ml de medio GM17SG y se dejó en incubación hasta alcanzar una OD_{600} de entre 0.5-0.8 (normalmente 0.6) a 30°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. Electrotransfromación. 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 IIL 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 μ l de buffer TE con 5 μ l de RNAasa 10 mg/ml.

III.2 Aislamiento de DNA a mediana escala

Se utilizó el Kit Wizard[®] 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 μ 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 μ l de estas bacterias para inocular 5 ml de medio de cultivo nuevo, se dejó en incubación a 30°C hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ 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 inducible con nisina y se incubó durante 1 hora más (en este tiempo las bacterias alcanzaron una DO₆₀₀ 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 μ l de PMSF 1 M más 1 μ 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l de agua y 50 μ l 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 μ l de SDS 20%, 1 volumen de DTT-LB, más 5 μ l 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 cm², 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 períodos 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[®], 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[®] 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 DO₆₀₀ 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 (DO₆₀₀ 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 μ l de PBS –Tween 0.05%, luego se agregaron 100 μ 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 μ l de PBS 1X, se realizó un frotis con 10 μ 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 μ 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 μ l (1×10^9 células) de las bacterias productoras de E7 (NZ9000/pVE3684:E7) con una micropipeta y se aplicaron 10 μ 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°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 µl de AIM-V, y finalmente se resuspendieron en 500 µl 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 2×10^6 células. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: (1) 50 µl de Fitohemaglutinina, (2) 50 µl de agua estéril y (3) 2 µg 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 CO₂ 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-γ e IL-2 se realizó mediante un ELISA con los Kit's mouse INF-γ 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 *Sall* 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 *Sall* y *EcoRV* se encuentran subrayados.

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

ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTAT
GAGCAATTAATGACAGCTCAGAGGAGGAGGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGGACAGAGCC
CATTACAATATTGTAACCTTTTGTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGGTTGTGCGTACAAAGCACACACGTAGAC
ATTGCTACTTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGCCCATCTGTTCTCAGAAACCATAA

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

GATCTAGAAGAGATTGAAAAACAGTATGATGTGATCGTGACAGATGTTATGGTAGGAAAAAGCGATGAGTTAGAA
ATTTT TTTTCTACAAAATGATTCCAGAAGCGATTATTGACAAGCTCAATGTGTTTTTAAACATCAGCTTTGCA
GACAGCTTGGCCACTAGAGCAAACCCATCCAAGAACCCCTTGGACTTTCATCGCAAAGAGCTTACCTTTACCCAC
TCCCCCAACAACGTTTTGCACGCCCCCCCCGCACGAAGTTAGACAGCCTAGCCGCAGAACTCAAAAACAGATT
CATCATTAAATAGCATTTAGGTCAAAGTGGCAAAGCTAAAAAGCTGGTCTTTACCTTTTGGCTTTTATTATTT
ACAATACAATTATTAGAGTTAAACCTGAAAATGAGGGTTTTTCTAAAAAATGATAACATAAGGAGCATAAAAA
TGGCTAAAAATAACACGAATAGACACTATTCGCTTAGAAAATTAaaaaaAGGTACTGCATCAGTAGCAGTGGCTT

TGAGTGTAAATAGGGGCAGGATTAGTTGTCAATACTAATGAAGTTAGTGCAAGAGTGTTTCCTAGGGGGACGGTAG
AAAACCCGGACAAAGCACGAGAACTTCTTAACAAGTATGACGTAGAGAACTCTATGTTACAAGCTAATAATGACA
AGTTAACAAGTGAAGAATAATAACTTAACAGATCAGAATAAAAACTTAACAAGTGAAGAATAAAAACTTAACAGATC
AGAATAAAAACTTAACAAGTGAAGAATAAAAACTTAACAGATCAGAATAAAAACTTAACAAGTGAAGAATAAGGAGT
TAAAAGCTGAGGAGAATAGGTTAACAAGTGAAGAATAAGGGTTAACTAAAAAGTTGAGTGAAGCTGAAGAAGAAG
CAGCAAATAAAGAGCGAGAAAATAAAGAAGCCATTGGTACCCTTAAAAAACCTTGGATGAGACAGTAAAAGATA
AAATTGCTAAGGAGCAAGAAAGTAAAGAAACCATTGGTACCCTTAAAAAACCTTGGATGAGACAGTAAAAGATA
AAATTGCTAAGGAGCAAGAAAGTAAAGAAACCATTGGTACCCTTAAAAAACCTTGGATGAGACAGTAAAAGATA
AAATTGCTAAGGAGCAAGAAAGTAAAGAAACCATTGGTACCCTTAAAAAACCTTGGATGAGACAGTAAAAGATA
AAATTGCGAGAGAGCAAAAAAGTAAACAAGACATTGGTGCCCTTAAACAAGAAATTAGCTAAAAAGATGAAGGAA
ACAAAGTTTCAGAAGCAAGCCGTAAGGGTCTTCGCCGTGACTTGGACGCATCACGTGAAGCTAAGAAACAGGTTG
AAAAAGATTTAGCAAACCTTGACTGCTGAAGTTGATAAGGTTAAAGAAGAAAAACAAATCTCAGACGCAAGCCGTC
AAGGTCTTCGCCGTGACTTGGACGCATCACGTGAAGCTAAGAAACAGTTGAAAAAGCTTTAGAAGAAGCAAACA
GCAAATTAGCTGCTCTTGAAGAACTTAACAAGAGCTTGAAGAAAGCAAGAAATTAACAGAAAAAGAAAAAGCTG
AGCTACAAGCAAACTTGAAGCAGAAGCAAAAGCACTCAAGAAACAATTAGCGAAACAAGCTGAAGAACTTGCAA
AACTAAGAGCTGGAAAAGCATCAGACTCACAAACCCCTGATGCAAAACCCAGGAAACAAGTTGTTCCAGGTAAG
GTCAAGCACCACAAGCAGGTACAAAACCTAACCAAAACAAGCACCATGAAGGAACTAAGAGACAGTTACCAT
CAACAGGTGAAACAGCTAACCCATTCTTCACAGCGGCAGCCCTTACTGTTATGGCAACAGCTGGAGTAGCAGCAG
TTGTAAAACGCAAAGAAGAAAATAAGCTATCACTTTGTAATACTGAGTGAACATCAAGAGAGAACCAGTCGGTT
CTCTCTTTTATGTATAGAGAAATGAGATTAAAGGAGTCAAACTTAACAAGCTCTTAAAAAGCTGACCTTTACTA
ATAATCGTCTTTTTTTTTATAATAAAGATGTTAATAATATAAATTGATAAATGAGATACATTTAATGATTATGACAA
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:

GTGTTTTGTAATCATAAAGAAATATTAAGGTGGGGTAGGAATAGTATAATATGTTTTATTCAACCGAACTTAATGG
GAGGAAAAATTAAGAAAGAACAGTTATGAAAAAAGATTATCTCAGCTATTTTAATGTCTACAGTGATACTTTC
TGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACGCTGACACAACTCAGATATTGCTAAACAAGATGCGACAATTTCAAG
CGCGCAATCTGCTAAAGCACAAAGCACAAAGTGGATAGCTTGAATCAAAAGTTGACAGCTTACAACAAAA
GCAAACAAGTACTAAAGCACAAATCGCTAAAATCGAAAGCGAACTGAAAGCACTTAATGCTCAAATTGCTACTTT
GAACGAAAGTATCAAAGAAGTACAAAGACATTGGAAGCTCAAGCAGTAGTGCTCAAGTTAACAGCTCAGCAAC
AAATTATATGGATGCTGTTGTTAATTCAAAATCTTTGACAGATGTTATTCAAAAGTAACAGCTATTGCTACTGT
TTCTAGTGCCAAACAAATCTTGGAAACAACAAGAAAAGAGCAAAAAGAGCTTAGCCAAAAGTCAGAACTGT
TAAAAAGAACTACAACCAGTTGTTTTCTTTTACAAAGTTTGGATTCTCAAGCTCAAGAATTGACTTCACAACA
AGCTGAACTCAAAGTTGCGACTTTGAACTATCAAGCAACAATTGCAACTGCGCAAGATAAAAAACAAGCTTTATT
AGATGAAAAAGCAGCTGCAGAAAAAGCAGCTCAAGAAGCAGCTAAAAACAAGCGGCTTATGAAGCTCAACAAAA
AGAAGCAGCACAAGCACAAGCAGCTTCAACAGCAGCAACTGCTAAAGCTGTAGAAGCAGCAACTTCATCAGCTTC
TGCTTCATCTAGTCAAGCTCCACAAGTAAGTACAAGCACTGATAATACAACATCAAATGCTAGTGCCTCAAACAG
TTCTAATAGTTTCAAACTCAAGTTCAAGTTCTAGCAGTTTCAAGCTCAAGCTCAAGCTCAAGTAATTCTAA

TGCTGGTGGGAATACAAATTCAGGCACTAGTACTGGAAATACTGGAGGAACAACACTACTGGTGGTAGCGGTATAAA
TAGTTCACCAATTGGAAATCCTTATGCTGGTGGTGGATGTACTGACTATGTATGGCAATACTTTGCTGCACAAGG
AATTTATATCAGAAATATCATGCCTGGTAATGGTGGACAATGGGCTTCTAATGGACCTGCCCAAGGCGTGCTCCA
TGTTGTAGGAGCTGCTCCTGGTGTATCGCATCAAGCTTCTCAGCTGATTTTGTGGATATGCAAACCTCACCTTA
CGGTCACGTAGCTATTGTAAAATCAGTTAATTCAGATGGTACAATTACTATCAAAGAAGGCGGATATGGTACAAC
TTGGTGGGGACATGAACGTACTGTAAGTGCCTCTGGTGTACTTTCTTGATGCCAAACTAGAAAAAAGTCTTAAT
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).

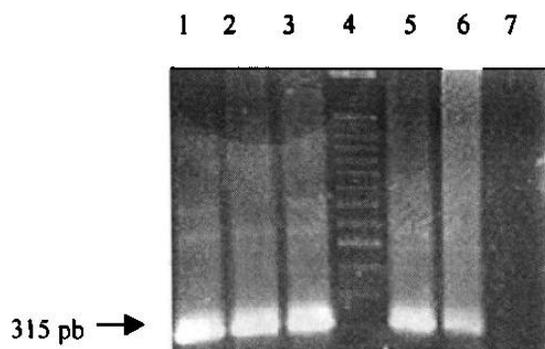


Figura. 10. Amplificación del gen E7. Se obtuvo por PCR el gen E7 a partir del plásmido pCDNA3E7 y se analizó en gel de agarosa 1%. Carriles 1-3, 5 y 6 plásmido pCDNA3E7; carril 4, Marcador de peso molecular 1 Kb, carril 7, control negativo.

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).

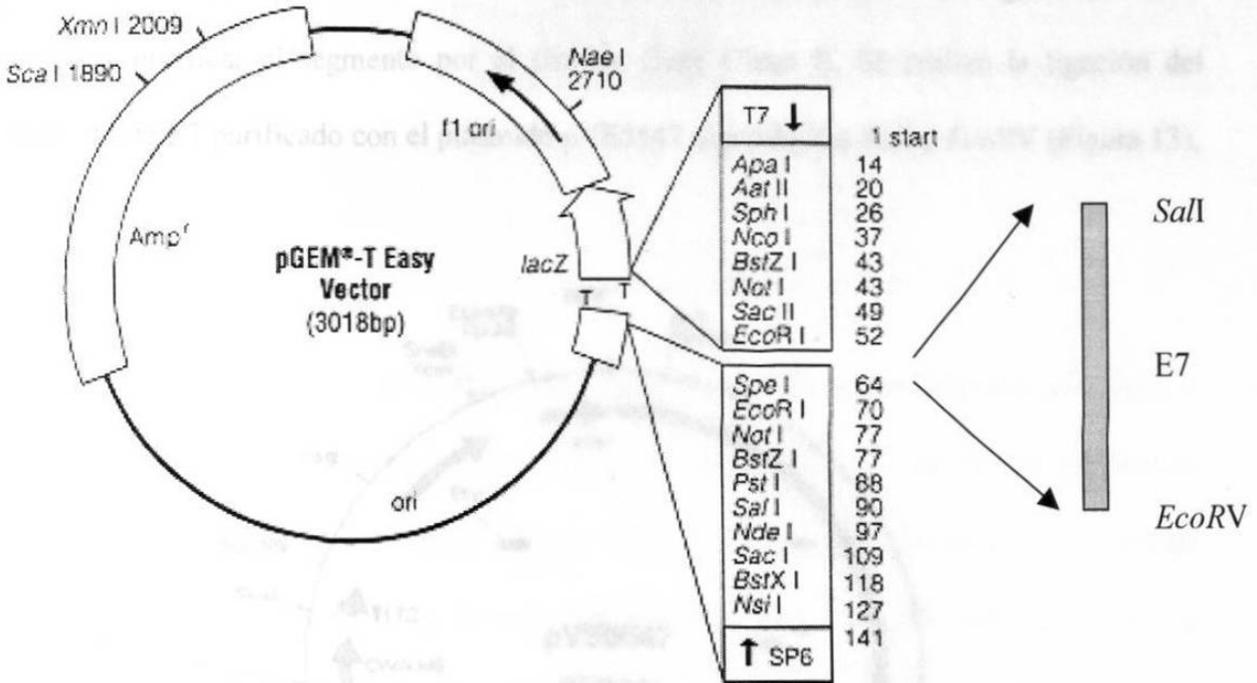


Figura 11. Mapa del vector pGEM-T utilizado para clonar el producto de PCR de E7.

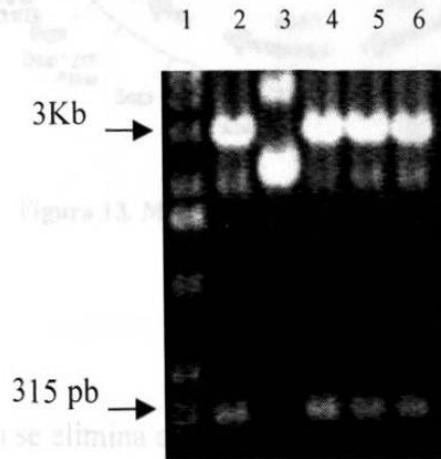


Figura 12. Caracterización de clonas recombinantes pGEMT-E7. Análisis de restricción de las clonas producto de la ligación pGEMT-E7. Carril 1, Marcador de peso molecular 1 Kb; carriles, 2, 4-6, clonas con inserto E7; carril 3, clona sin inserto.