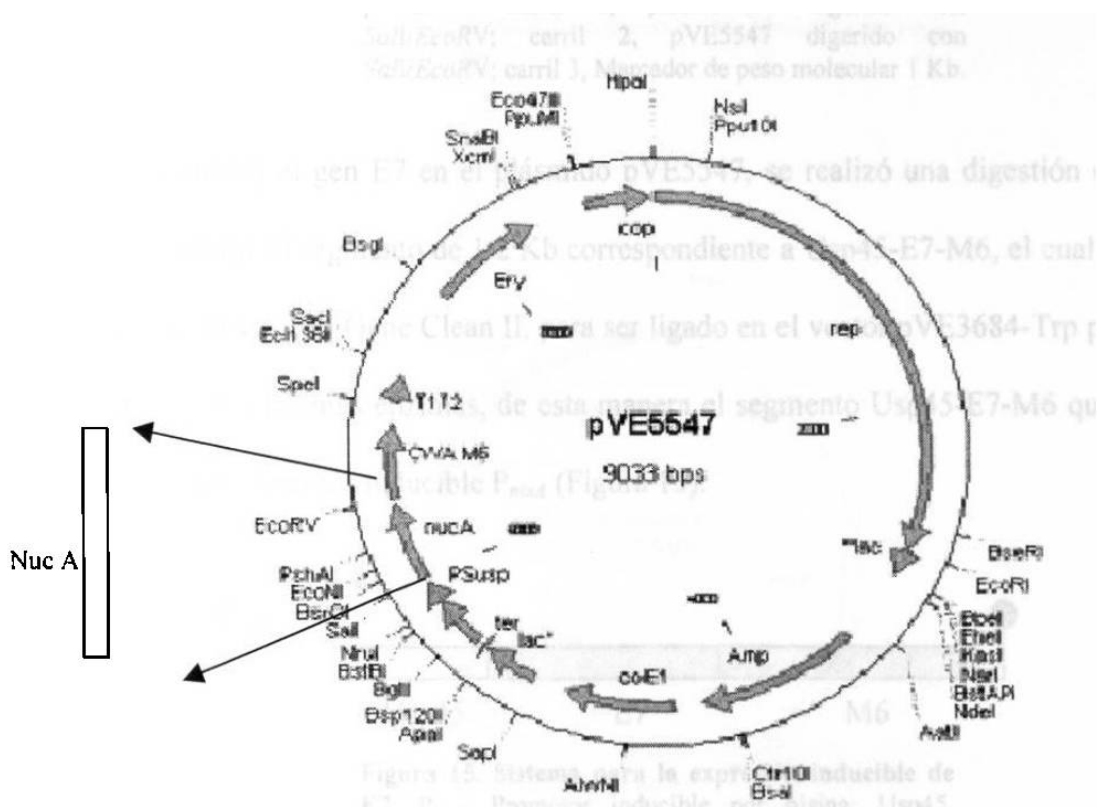


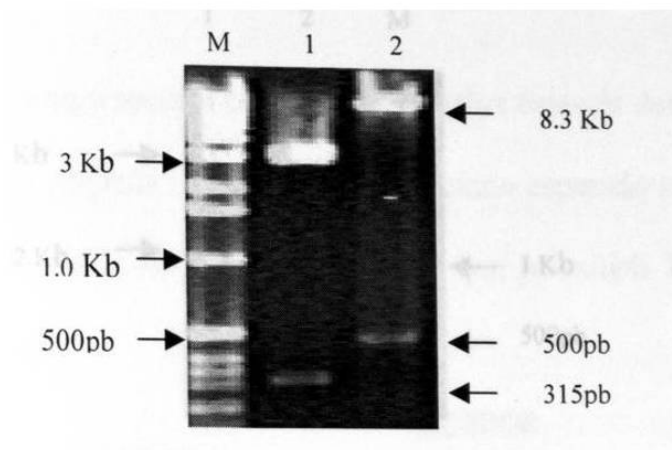
## CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR RECOMBINANTE PARA LA EXPRESIÓN DE E7 EN SUPERFICIE

Con la finalidad de tener una mayor concentración del plásmido pGEMT-E7, se realizó un aislamiento a mediana escala de la clona seleccionada para posteriormente digerir con *Sall* y *EcoRV* y purificar el segmento por el sistema Gene Clean II. Se realizó la ligación del segmento de E7 purificado con el plásmido pVE5547 digerido con *Sall* y *EcoRV* (Figura 13),



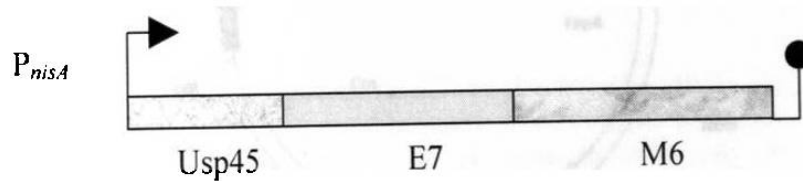
**Figura 13. Mapa del vector de expresión pVE5547.**

mediante esta digestión se elimina el gen NucA del vector y en su lugar se puede clonar en fase de lectura el gen E7 (Figura 14).



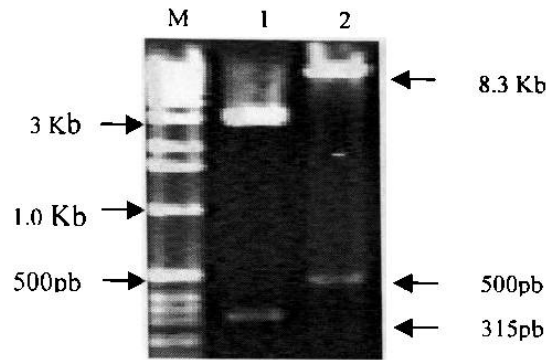
**Figura 14. Caracterización de los plásmidos usados.** Análisis de restricción de los vectores pGEMT-E7 y pVE5547. Carril 1, pGEMT-E7 digerido con *SalI/EcoRV*; carril 2, pVE5547 digerido con *SalI/EcoRV*; carril 3, Marcador de peso molecular 1 Kb.

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).



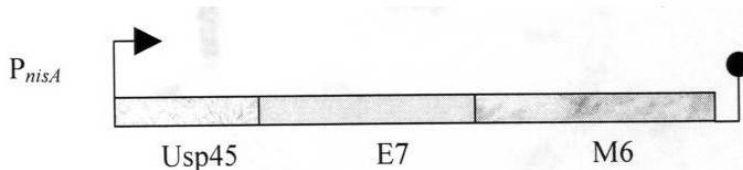
**Figura 15. Sistema para la expresión inducible de E7.**  $P_{nisA}$ . Promotor inducible por nisina; Usp45. Secuencia señal de la proteína Usp45; E7. Gen E7 y M6. Secuencia de anclaje de la proteína M6.

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).



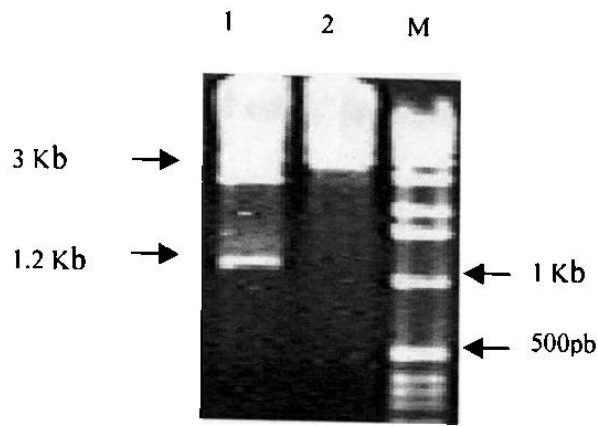
**Figura 14. Caracterización de los plásmidos usados.** Análisis de restricción de los vectores pGEMT-E7 y pVE5547. Carril 1, pGEMT-E7 digerido con *SalI/EcoRV*; carril 2, pVE5547 digerido con *SalI/EcoRV*; carril 3, Marcador de peso molecular 1 Kb.

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).

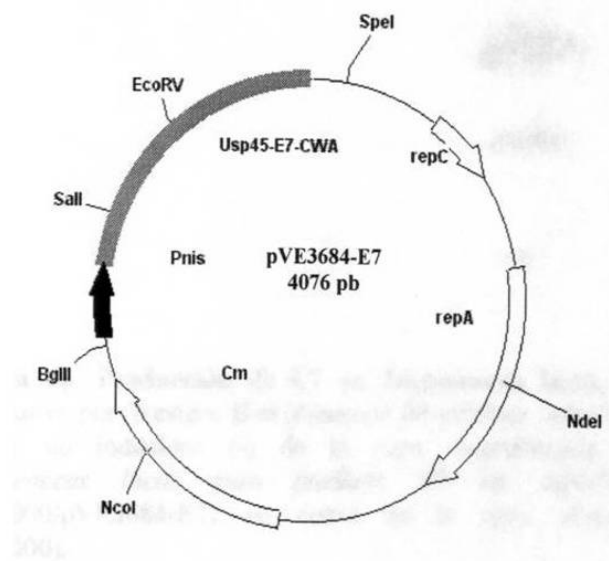


**Figura 15. Sistema para la expresión inducible de E7.**  $P_{nisA}$ . Promotor inducible por nisina; Usp45, Secuencia señal de la proteína Usp45; E7, Gen E7 y M6. Secuencia de anclaje de la proteína M6.

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*III/*Spe*I; carril 2, pVE3684-E7 no digerido. M, Marcador de peso molecular 1 Kb.

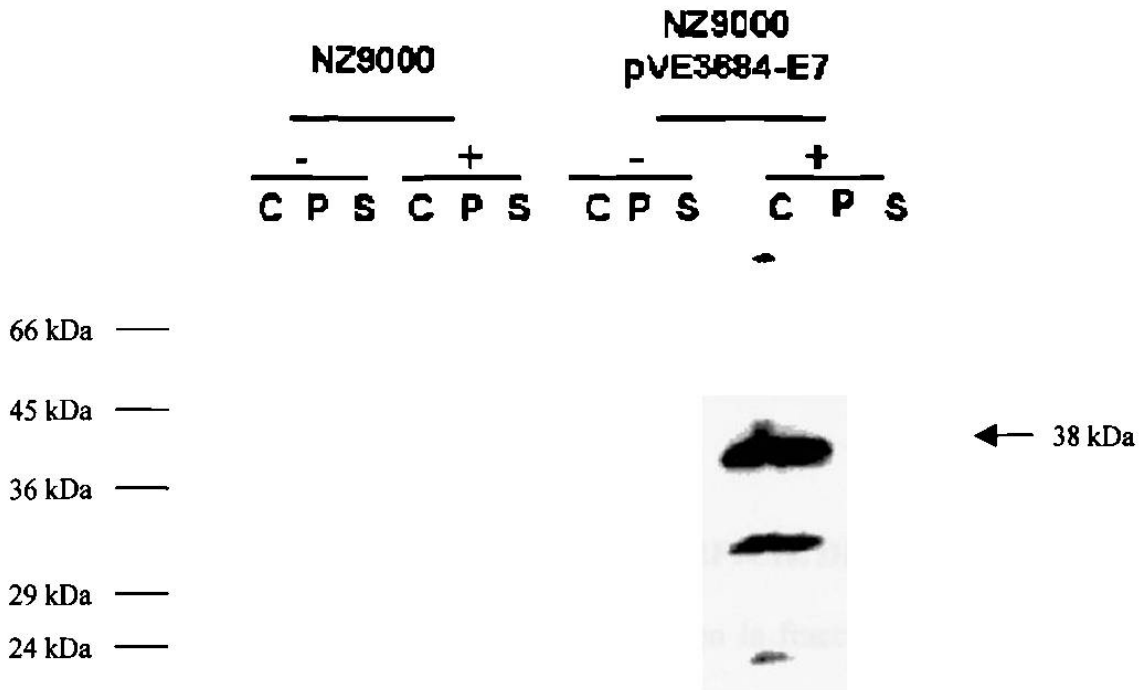


**Figura 17. Mapa del vector recombinante para la expresión de E7 en superficie de *Lactococcus lactis*.**

### ***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

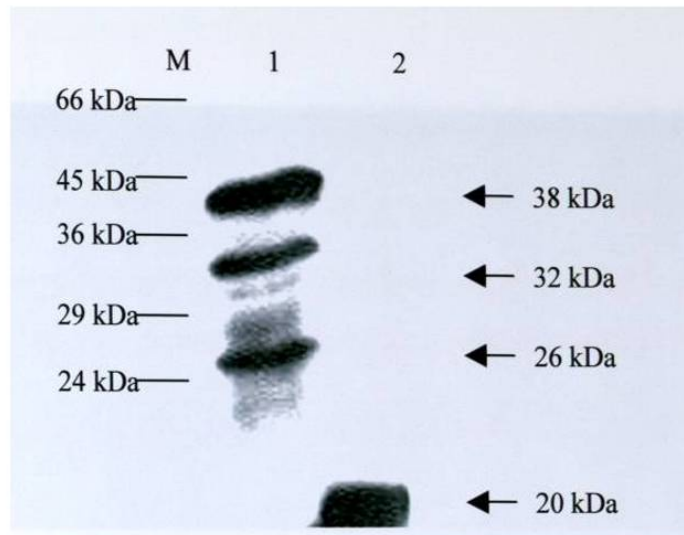
aproximadamente 32 kDa representa el estado de la proteína después del corte de la Usp45, (E7-CWA), la banda más pequeña (26 kDa) tiene el tamaño esperado para la proteína E7-CWA/ después del corte por la sortasa (Figura 19) lo que permitiría la unión a la pared celular (Figura 8 y Figura 9).



**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.

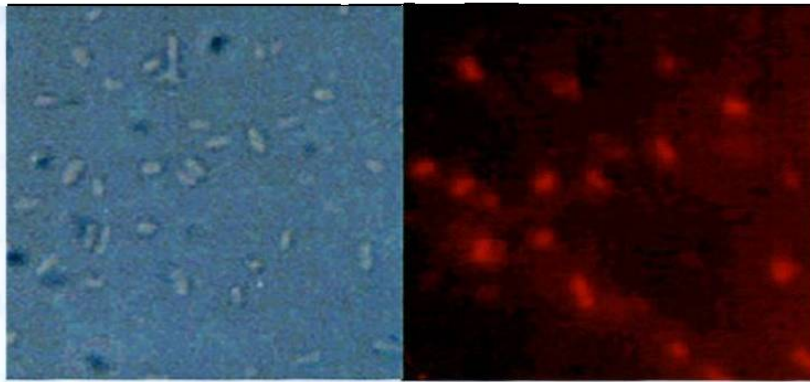


**Figura. 19. Cuantificación de E7 mediante Western blot.** Carril 1, fracción citoplásmica de la cepa productora de E7 (NZ9000/pVE3684-E7); carril 2, fracción sobrenadante de una cepa de referencia productora de E7 (pSEC). M, Marcador de peso molecular.

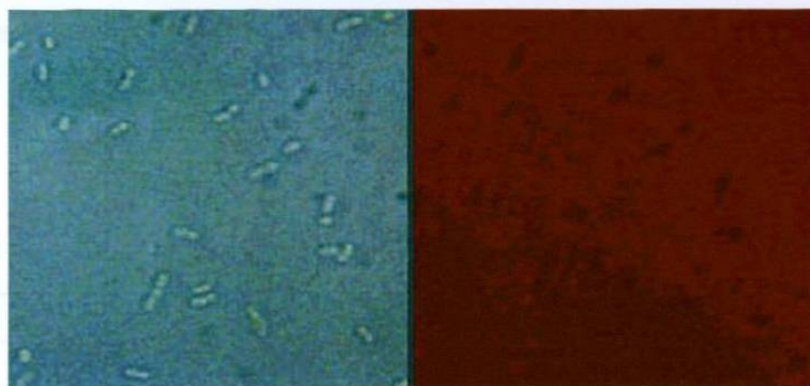
### **EXPRESION DE LA PROTEINA E7 EN LA SUPERFICIE DE *Lactococcus lactis***

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).

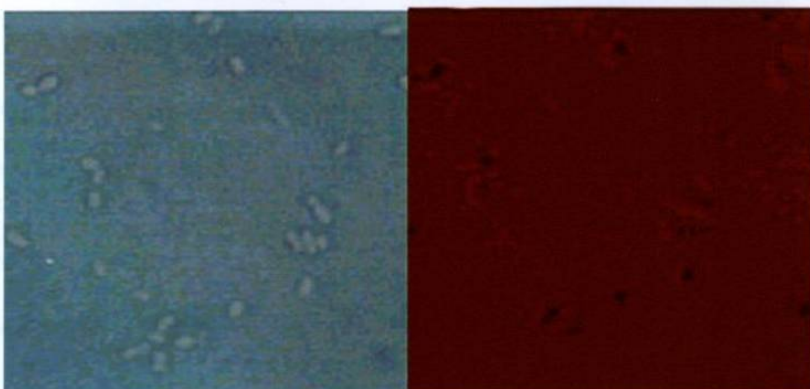
(A)



(B)



(C)

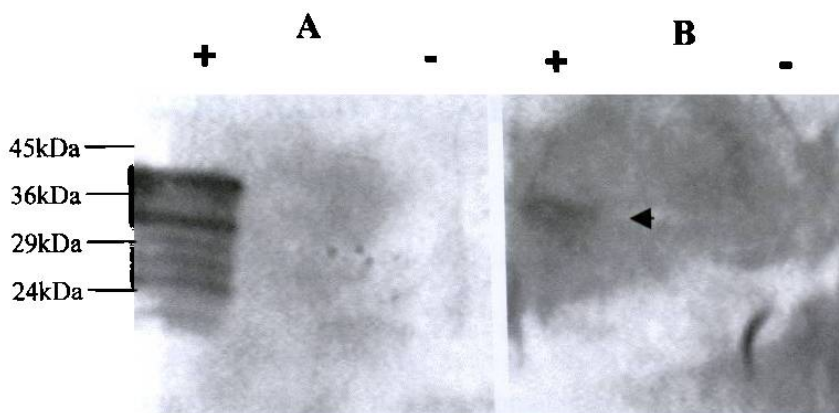


**Figura 20. Detección de E7 en la superficie de *Lactococcus lactis* por inmunofluorescencia.** Panel derecho: micrografías de inmunofluorescencia de la cepa recombinante de *Lactococcus lactis* tratadas con anti-E7 y anti-IgG Alexa Fluor (A); cepa recombinante tratada únicamente con el anti-IgG Alexa 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

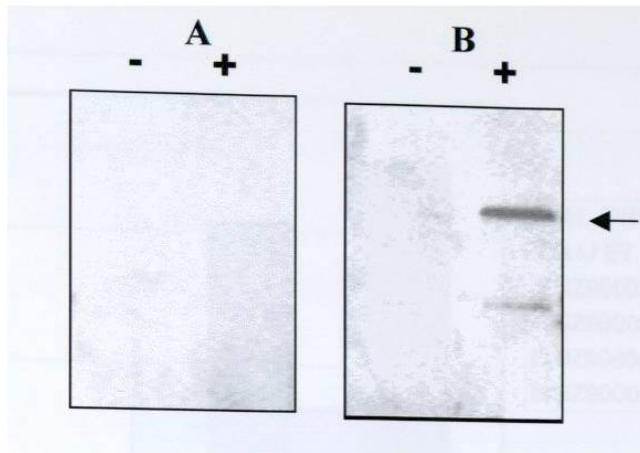
Cuando se logró comprobar la presencia de la proteína E7 sobre la superficie de *Lactococcus lactis* se inmunizaron grupos de 5 ratones intranasalmente a tres dosis con  $1 \times 10^9$  células. Siete días después de la última inmunización se obtuvo sangre por vía retroorbital, de donde se aisló el 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.



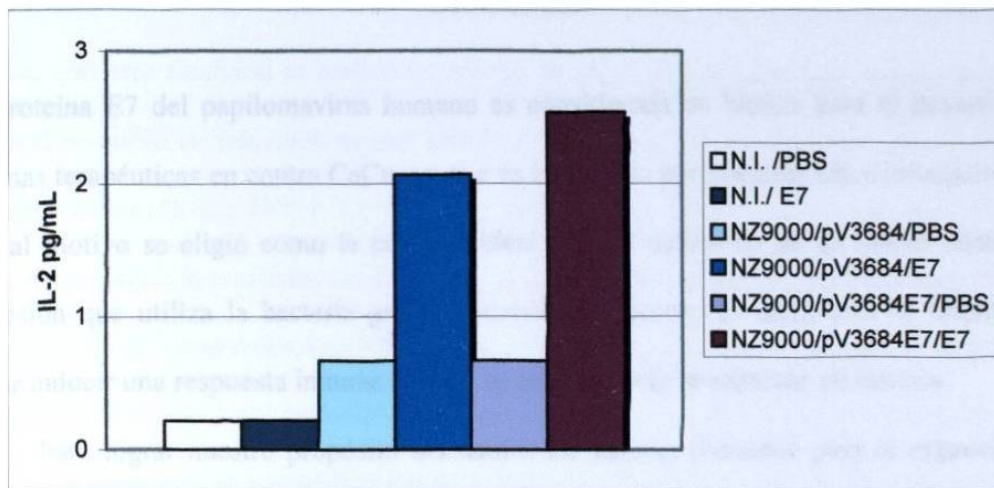


**Figura 22. Detección de anticuerpos anti-E7 por Western Blot en suero de ratones inmunizados con *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie. A, Suero de ratones inmunizados con la cepa control (NZ9000/pVE3684). B, Suero de ratones inmunizados con la cepa productora de E7 (NZ9000/pVE3684-E7). (+) 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 PRODUCCION DE INF- $\gamma$**

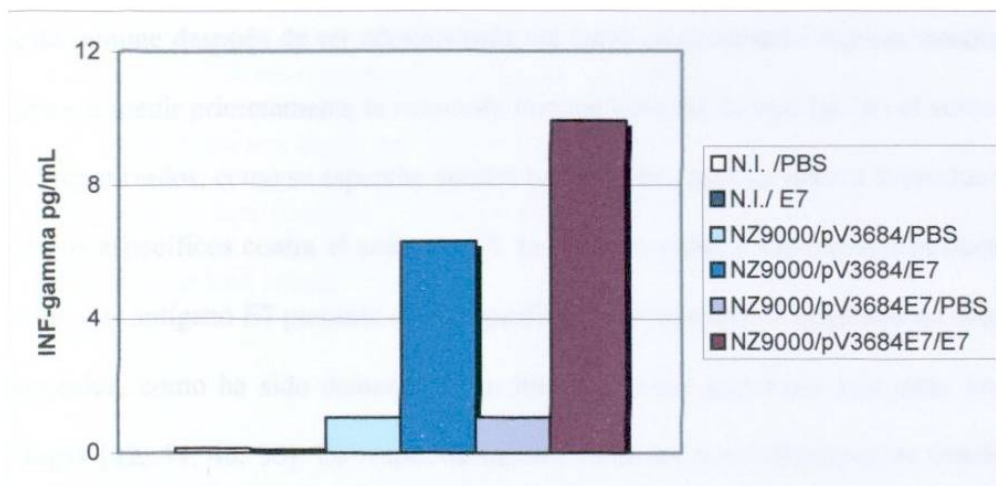
Con el objetivo de determinar el efecto de la administración de la cepa productora de E7 (NZ9000/pVE3684-E7) sobre la respuesta inmune de tipo celular, se monitoreó la inducción de dos importantes citocinas relacionadas con este tipo de respuesta, las cuales son INF $\gamma$  e IL-2. Para este ensayo 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.

## 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

#### **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.



## 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 Distèche 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
- 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*l 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-Chouu. 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/acal.html](http://www.asmsusa.org/acarc/acal.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

*[Handwritten mark]*





