

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



“Desarrollo de una Vacuna Probiótica para Combatir
el Cáncer Cérvico-Uterino: Construcción de Cepas
Recombinantes de *Lactococcus lactis* que expresan la E7
del VPH-16 y la IL-12 murina”

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

LUIS GILBERTO BERMUDEZ HUMARAN

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
MAYO DEL 2002

**“Desarrollo de una Vacuna Probiótica
para combatir el Cáncer Cérvico Uterino”**

TD
RC280
.U8
B4
2002
c.1



1080124503

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



*Anticuerpos monoclonales Vacunas Recombinantes para Combatir
el Cáncer: Casos de Estudio: Construcción de Copias
Recombinantes de Lectinas que expresan la E7
del VPH-16 y la IL-12 murina."*

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

LUIS GILBERTO BERMUDEZ HUMARAN

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.
MAYO DE 2002



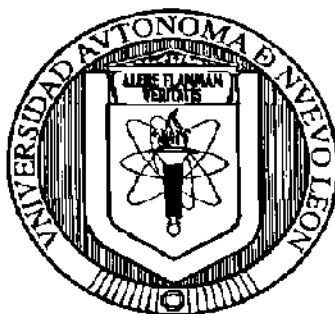
TD
RC280
.U8
BY
2002



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



**“Desarrollo de una Vacuna Probiótica para Combatir el Cáncer
Cérvico-Uterino: Construcción de Cepas Recombinantes de
Lactococcus lactis que expresan la E7
del VPH-16 y la IL-12 murina”**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

LUIS GILBERTO BERMUDEZ HUMARAN

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON

MAYO DEL 2002

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA



**“Desarrollo de una Vacuna Probiótica para Combatir el Cáncer
Cérvico-Uterino: Construcción de Cepas Recombinantes de
Lactococcus lactis que expresan la E7
del VPH-16 y la IL-12 murina”**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

LUIS GILBERTO BERMUDEZ HUMARAN

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON

MAYO DEL 2002

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA

Los miembros de esta comisión recomendamos que la presente tesis de

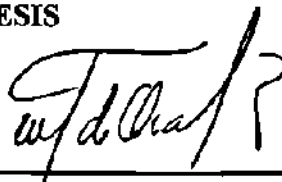
Luis Gilberto Bermúdez Humarán sea aceptada como requisito

parcial para obtener el grado académico de

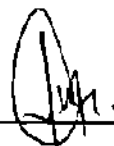
Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

COMISION DE TESIS

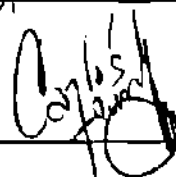
Dr. Roberto Montes de Oca Luna
Presidente



Dr. Juan Manuel Alcocer González
Secretario



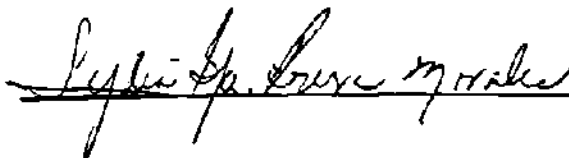
Dr. Carlos Hernández Luna
Vocal



Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal



Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Roberto Montes de Oca Luna y la asesoría del Dr. Reyes Tamez Guerra y la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, y fue apoyada por la beca de CONACYT 129084 y los proyectos de PAICYT CN-319-00 y CN-176-99 y de CONACYT 37523-N.

Contenido

Capítulo 1

1.1	Introducción General	6
1.2	Antecedentes	9
1.2.1	Cáncer cérvico-uterino	9
1.2.2	Tratamiento del CaCu	10
1.2.3	Virus del papiloma humano	11
1.2.4	Infección y transformación por el VPH	12
1.2.5	Función de la oncoproteína E7	14
1.2.6	Respuesta inmune contra el VPH	15
	Respuesta inmune humoral	16
	Respuesta inmune celular	16
1.2.7	Papel de las citocinas en el CaCu	18
1.2.8	Estrategias en el desarrollo de vacunas contra el VPH	19
	Vacuna profiláctica contra el VPH	20
	Vacuna terapéutica contra el VPH	21
1.2.9	Uso de bacterias en el desarrollo de vacunas	22
	<i>Lactococcus lactis</i> como vector de expresión	23
1.2.10	Uso de adyuvantes para el desarrollo de vacunas	24
	Interleucina-12	25
1.3	Justificación de la tesis	26
1.4	Referencias	27

Capítulo 2

2.1	Producción de la proteína E7 del VPH-16 en <i>Lactococcus lactis</i>	37
2.2	Introducción	38
2.2	Material y métodos	41
2.2.1	Cepas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos	41
2.2.2	Manipulaciones del ADN	41
2.2.3	Enzimas	41

Contenido

2.2.4	Amplificación del gene <i>E7</i>	43
2.2.5	Construcción de vectores para la expresión de <i>E7</i> en <i>Lactococcus lactis</i>	43
2.2.6	Caracterización del gene <i>E7</i>	43
2.2.7	Transformación de <i>Lactococcus lactis</i>	43
2.2.8	Extracción de proteínas de <i>Lactococcus lactis</i>	44
2.2.9	Western Blot de la proteína <i>E7</i>	45
2.3	Resultados	46
2.3.1	Caracterización de <i>E7</i>	46
2.3.2	Construcción de cassettes para la expresión de <i>E7</i>	49
2.3.3	Producción de <i>E7</i> en <i>Lactococcus lactis</i>	49
2.3.4	ClpP no esta involucrada en la degradación de <i>E7</i>	51
2.3.5	DnaK no esta involucrada en la presentación de <i>E7</i> para su proteolisis	52
2.4	Discusión	54
2.4.1	Producción de <i>E7</i> en <i>Lactococcus lactis</i>	54
2.4.2	Estabilidad de <i>E7</i> en el citoplasma de <i>Lactococcus lactis</i>	54
2.4.3	Secreción de <i>E7</i> y perspectivas	55
2.5	Referencias	56
Capitulo 3		
3.1	Estabilización en la producción de <i>E7</i> en <i>Lactococcus lactis</i>	62
3.2	Introducción	63
3.3	Material y métodos	65
3.3.1	Cepas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos	65
3.3.2	Manipulaciones del ADN	66
3.3.3	Fusión del propéptido sintético LEISSTCDA a <i>E7</i>	66
3.3.4	Fusión de Nuc al extremo N- de <i>E7</i>	66
3.3.5	Fusión de LEISSTCDA al extremo N- de Nuc- <i>E7</i>	66
3.3.6	Fusión de Nuc al extremo N- ó C- de <i>E7</i>	66
3.3.7	Condiciones para la inducción con la nisina	67

Contenido

3.3.8	Ensayo de la nucleasa	67
3.3.9	Inmunodetección	67
3.4	Resultados	69
3.4.1	LEISSTCDA no mejora la secreción de E7	69
3.4.2	La fusión Nuc al extremo N- de E7 rescata su producción en <i>Lactococcus lactis</i>	70
3.4.3	Nuc protege a E7 de la degradación cuando es fusionada al extremo N- ó al C-	74
3.4.4	Parámetros para la inducción con la nisina	75
3.5	Discusión	78
3.5.1	Estabilización de proteínas heterólogas en <i>Lactococcus lactis</i>	78
3.5.2	Perspectivas en el uso de <i>Lactococcus lactis</i> para la producción de proteínas heterólogas	78
3.6	Referencias	80
Capítulo 4		
4.1	Producción de la Interleucina-12 murina en <i>Lactococcus lactis</i>	83
4.2	Introducción	84
4.3	Material y métodos	87
4.3.1	Cepas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos	87
4.3.2	Métodos usados	88
4.3.3	Mutagénesis dirigida	88
4.3.4	Construcción de una cepa de <i>Lactococcus lactis</i> que expresa las subunidades p35 y p40 de la IL-12	89
4.3.5	Construcción del cassette de expresión de una IL-12 de fusión	90
4.3.6	Ratones C57BL/6	90
4.3.7	Inducción <i>in vitro</i> de IFN- γ	90

Contenido

4.3.8	Administración de la cepa recombinante de <i>Lactococcus lactis</i> recombinante que expresa la IL-12	90
4.3.9	Inducción <i>in vivo</i> de IFN- γ	90
4.3.10	Estadísticas	90
4.4	Resultados	91
4.4.1	Las subunidades p35 y p40 son procesadas correctamente por <i>Lactococcus lactis</i>	91
4.4.2	Producción de una IL-12 de fusión en <i>Lactococcus lactis</i>	96
4.4.3	Bioactividad de la IL-12 producida por <i>Lactococcus lactis</i>	97
4.4.4	La administración de la cepa recombinante de <i>Lactococcus lactis</i> recombinante induce la producción de IFN- γ	98
4.5	Discusión	100
4.5.1	<i>Lactococcus lactis</i> como un vector para la producción de IL-12	100
4.5.2	<i>Lactococcus lactis</i> como vector de expresión para el desarrollo de una vacuna y para terapia antitumoral	101
4.6	Referencias	104
Capítulo 5		
5.1	Inducción de una respuesta inmune contra la proteína E7	110
5.2	Introducción	111
5.3	Material y métodos	114
5.3.1	Cepas y métodos usados	114
5.3.2	Preparación de células para ensayos <i>in vitro</i>	114
5.3.3	Inmunización	114
5.3.4	Obtención de células de bazo	114
5.3.5	Inducción de IFN- γ e IL-2	114
5.3.6	Estadísticas	115

Contenido

Resultados	116
5.4.1 La proteína híbrida Nuc-E7 es más inmunogénica que la E7 nativa	116
5.4.2 La co-administración de las cepas de <i>Lactococcus lactis</i> expresando la proteína Nuc-E7 y la IL-12 aumenta la producción de IFN- γ e IL-2	117
5.4 Discusión	120
5.5.1 <i>Lactococcus lactis</i> como vector para expresar antígenos y citocinas a través de mucosas	120
5.5.2 <i>Lactococcus lactis</i> como un vector para el desarrollo de una nueva vacuna para combatir el cáncer cérvico-uterino (CaCu)	120
5.6 Referencias	122
Capítulo 6	
Conclusiones	123