



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"USO DE LA SECUENCIA CODIFICADORA DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA DEL CÓLERA COMO POTENCIADOR EN VACUNAS GÉNICAS"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :  
ALBA EVELYN SÁNCHEZ VILLARREAL

Directora de Tesis: Dra. Leticia Rocha Zavaleta

2005



m 346733



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alba Evelyn Sánchez Villarreal

FECHA: 10/08/05

FIRMA: [Signature]

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Uso de la secuencia codificadora de la Subunidad B de la toxina del cólera como potenciador en vacunas génicas".

realizado por : *Alba Evelyn Sánchez Villarreal.*

con número de cuenta 09432393-1 , quien cubrió los créditos de la carrera de: *Biología.*

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director  
Propietario

Dra. Leticia Rocha Zavaleta.

Propietario

Dra. Gabriela Rosas Salgado.

Propietario

M. en C. María Guadalupe Ordaz Téllez.

Suplente

Dra. Patricia Ramos Morales.

Suplente

M. en C. Alfredo Martínez Peñaloza.

Consejo Departamental de Biología.

[Signature]  
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

**El presente trabajo se realizó en el departamento de Biología  
Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones  
Biomédicas de la UNAM , bajo la dirección de la Dra. Leticia  
Rocha Zavaleta.**

## **Dedico este trabajo**

A mis padres María Elena y Raúl por traerme a esta maravillosa vida, por su amor y apoyo. Por ser los mejores padres que pudieron haberme tocado para convertirme en la persona que soy ahora.

A Carlos Andrés por obsequiarme los mejores y más dulces momentos de la vida, por tu amor incondicional, tu comprensión, tus palabras sabias y fortificantes, por tu paciencia y todos tus cuidados. Te amo.

A todas las personas, amigos y familiares que me brindaron su ayuda directa o indirectamente para la realización de este trabajo.

## Agradecimientos

Al Gran Arquitecto Del Universo por permitirme vivir y llegar hasta aquí.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por su paciencia y su inigualable dirección en la realización de esta tesis.

A las Doctoras Gaby Rosas y Paty Ramos, a los Maestros en Ciencias Lupita Ordaz y Alfredo Martínez, por haber revisado y corregido este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio Tonatiuh por enseñarme lo que necesitaba y por su amistad, a Guillermo por su ejemplo.

A mis amigos Ethel, Julio, Paty, Roberto, Hugo, Fer, Rosalba, Fanny, Norma, Oscar, Frank, Fermín, entre otros, por ese amor fraternal y los bellos recuerdos que siempre estarán conmigo.

A mis tías Celsa y Alba por su cariño y por el apoyo brindado durante mi carrera universitaria.

A mis abuelos por ser la raíz del árbol de mi vida y en especial a Arnulfo por ser mi ángel guardián.

# ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Introducción.</b>	
2.1. Vacunas.....	3
2.1.1. Vacunas vivas atenuadas.....	3
2.1.2. Vacunas inactivadas.....	5
2.1.3. Vacunas de nueva generación contra toxinas.....	5
2.1.4. Vacunas recombinantes.....	7
2.1.5. Vacunas génicas.....	8
2.2. Activación Inmune mediada por vacunas.....	10
2.2.1. Características de los anticuerpos.....	11
2.2.2. Funciones de los Anticuerpos.....	13
2.3. Adyuvantes.....	14
2.3.1. Toxina del Cólera.....	16
2.3.2. Virus del Papiloma Humano.....	18
2.3.3. Características de HPV 16.....	20
2.3.4. Epidemiología.....	24
2.3.5. Vacunas.....	26
2.3.6. Vacuna de DNA.....	27

### 3. Objetivos.

3.1. Objetivo General.....	29
3.2. Objetivos Particulares.....	29

### 4. Hipótesis.....30

### 5. Materiales y Métodos.

5.1. Electroforesis en Geles de Agarosa.....	31
5.2. Digestión Enzimática de DNA.....	31
5.3. Ligación de Fragmentos de Restricción de DNA en Vectores de expresión.....	32
5.4. Recuperación de DNA de Geles de Agarosa por Electroelusión.....	33
5.5. Purificación del DNA por Fenol:Cloroformo y Extracción por Precipitación con Etanol (EtOH).....	34
5.6. Transformación de <i>Escherichia coli</i> competentes.....	35
5.7. Preparación de DNA plasmídico (Miniprep).....	36
5.8. Preparación de DNA plasmídico (Maxiprep).....	37
5.9. Cuantificación de DNA.....	38
5.10. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	39
5.11. Secuenciación.....	41
5.12. Análisis de RNA.....	42
5.13. Inmunización.....	42

5.14. Colecta de muestras.....	43
5.15. Análisis de la presencia de anticuerpos por el método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	44

## **6. Resultados.**

6.1. Obtención del gen L1.....	46
6.2. Clonación del gen L1 dentro del vector pcDNA3.....	47
6.3. Estudio de la expresión de L1 y ctxB a partir de los plásmidos.....	52
6.4. Generación de anticuerpos en los ratones vacunados.....	54
6.5. Efecto adyuvante de pctxB sobre la producción de anticuerpos del tipo IgA en secreciones cervicales.....	55
6.6. Efecto adyuvante de pctxB sobre la producción de anticuerpos del tipo IgA en extractos fecales.....	57
6.7. Efecto adyuvante de pctxB sobre la producción de anticuerpos del tipo IgG en suero.....	60

7. Discusión.....	64
-------------------	----

8. Conclusiones.....	76
----------------------	----

9. Apéndice A.....	77
--------------------	----

10. Bibliografía.....	80
-----------------------	----



## 1.- RESUMEN.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad adyuvante de la secuencia codificadora de la subunidad B de la toxina del cólera (ctxB), para la producción de anticuerpos mediada por una vacuna de DNA que contiene la secuencia génica del gen L1 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV 16), administrada por vía oral en ratones. Para este fin se clonó la secuencia codificadora de ctxB en el vector de expresión pcDNA3 para generar el plásmido pctxB, y en el vector que contiene al gen L1 para generar el plásmido quimérico pctxB/L1. La vacuna de DNA fue administrada sola o en combinación con pctxB, o bien con la subunidad B recombinante como control positivo.

Los anticuerpos IgA secretorios e IgG circulantes fueron evaluados en secreciones cervicales, extractos fecales y suero, respectivamente. Los resultados mostraron que hubo una potenciación en la producción de anticuerpos encontrados en extractos fecales y en suero, cuando se inmunizó con el plásmido quimérico, sin embargo la respuesta mayor fue inducida por la subunidad B recombinante. El nivel de anticuerpos encontrado en las secreciones cervicales, producido por el plásmido quimérico fue similar al producido por la toxina recombinante (no hubo una diferencia significativa).

Los resultados sugieren que la utilización de la secuencia génica de la subunidad B de la toxina del cólera en una vacuna génica contra L1 y administrada por vía oral, puede incrementar significativamente la producción de anticuerpos

específicos en la mucosa cervical y ano-genital, por lo que queda demostrada la capacidad adyuvante de ctxB, mediante la inmunización con el plásmido quimérico pctxB/L1.

## **2. INTRODUCCIÓN.**

### **2.1. Vacunas.**

Vacunar: Inocular a un individuo con una cierta sustancia que le confiera inmunidad contra una enfermedad determinada.

La vacunación contra enfermedades infecciosas data de hace más de 200 años, y ha demostrado ser una intervención exitosa. Las primeras vacunas, como la desarrollada por Jenner en 1798, se basaron en el uso de un microorganismo que en apariencia era igual, o muy parecido, al que causaba la enfermedad pero que no era capaz de generarla. En el caso de la vacuna contra la viruela, Jenner utilizó un virus similar al de la viruela humana pero natural de las vacas, que era incapaz de generar enfermedad en el hombre (Makela, 2000). Comprobó que la inoculación dérmica con el virus proveniente de las vacas, inducía inmunidad contra el virus humano cuando se retaba subsecuentemente con éste (Jenner, 1798), lo que marcó el principio de las ciencias de las vacunas y la inmunología (Bailey y Jenner, 1995).

#### **2.1.1. Vacunas vivas atenuadas.**

Este tipo de vacunas consiste en utilizar un agente infeccioso (Vacunas monovalentes) o varios (vacunas polivalentes) vivo(s) y homólogo(s) al que produce la enfermedad, pero cuya virulencia haya sido atenuada, de manera que

sin producir ninguna lesión secundaria induzca inmunidad duradera frente al agente homólogo virulento. El sistema de atenuación más utilizado en la actualidad, se basa en realizar un gran número de pases o replicaciones del virus o bacteria virulento en líneas celulares (virus) o medios de cultivo (bacterias), de tal manera que los microorganismos pierdan virulencia y no produzca algún tipo de lesión en su hospedero, pero sigan teniendo la capacidad de replicarse o multiplicarse lo suficiente para que el sistema inmune pueda procesarlo (Sánchez-Vizcaíno, 2003). El desarrollo de este tipo de vacunas fue, en un comienzo, completamente empírico, ya sea por su hallazgo en la naturaleza o por su desarrollo en el laboratorio. Calmet y Guérin desarrollaron en 1909 una bacteria que lleva sus nombres (BCG) pasando una cepa de *Mycobacterium bovis* de un cerdo a otro durante 13 años. Lo que ocurrió durante estos pasajes sucesivos fue la acumulación de mutaciones (ocurridas al azar) generando en la bacteria un gran número de cambios. La habilidad de Calmet y Guérin estuvo en seleccionar aquellas bacterias que habían perdido los factores que hacían que causara enfermedad en humanos pero conservando, sin embargo, su estructura externa y su capacidad de multiplicarse (Makela, 2000). Así, al inocularse en humanos, el sistema inmune se prepara produciendo células B de memoria para una futura infección, así como células T citotóxicas, pero la enfermedad está ausente porque la bacteria perdió los componentes que la causaban.

Antipaperas, antisarampión, antirubéola y antivariola, son vacunas pediátricas de virus atenuados que se utilizan desde 1960 (Hilleman, 2003).

### **2.1.2. Vacunas inactivadas.**

En el año de 1885, Pasteur demostró que era posible inactivar a los microorganismos que causaban las enfermedades y utilizarlos como vacuna, de aquí se derivaron las "vacunas inactivadas". Los métodos de inactivación utilizados inicialmente consistían en tratamientos térmicos que mataban a los microorganismos tratando de que se conserven las estructuras externas de los mismos. Así las vacunas inactivadas están hechas con los mismos microorganismos que pueden causar la enfermedad pero incapacitados para multiplicarse (Makela, 2000). Las vacunas muertas o inactivadas están formadas por el o los microorganismos completos pero inactivados por algún método físico o químico. Sin embargo, suelen inducir una respuesta inmunitaria menor que las vacunas atenuadas, fundamentalmente ligada a linfocitos CD 4+ con producción de anticuerpos (Sánchez-Vizcaíno, 2003). Actualmente contamos con vacunas de este tipo contra la influenza (Bardiya y Bae, 2005), la DTP (Godfroid et al, 2004), rabia (Rai Chowdhuri et al, 1984), hepatitis A (Hilleman, 1993) , poliomielitis (Poliomyelitis prevention, 1997), entre otras.

### **2.1.3. Vacunas de nueva generación contra toxinas.**

Con el correr de los años se comprendió que no era necesaria la presencia de los microorganismos completos para la inmunización y que bastaba con alguno de sus componentes, como una proteína tóxica purificada previamente identificada

como la causa esencial de la enfermedad (Makela, 2000). Esto dio origen a las vacunas de subunidades (recombinantes), que consisten en el uso de sólo una parte del microorganismo, en lugar del microorganismo completo, tal es el caso de la utilización de polisacáridos capsulares en neumococo (Chudwin, 1989). Sin embargo se vio que estos polisacáridos solo daban lugar a una respuesta mediada por células B y lo que se necesitaba también era una respuesta de células T que solo podía ser mediada por una conjugación con una proteína Antígeno (Ag), lo cual daría lugar a una memoria inmunológica (Makela, 2000), tal fue el caso de la vacuna contra *H. Influenzae* tipo B (Makela, 1995).

Estas vacunas fueron introducidas en la década de 1920, siendo las primeras la del tétano y la difteria. Sin lugar a dudas esto representaba un gran avance, ya que evitaba el riesgo de inocular microorganismos enteros, ya sea muertos o atenuados. Sin embargo, en un comienzo esta estrategia no solucionaba el inconveniente y riesgo de cultivar grandes cantidades de microorganismos potencialmente patógenos. Pero entonces la posibilidad de manipular los genes y prescindir de los microorganismos patógenos dio impulso a una nueva generación de vacunas.

#### 2.1.4. Vacunas recombinantes.

Una vez demostrado que en muchos casos no es necesaria la presencia del microorganismo completo para la inmunización y que basta con una de sus proteínas, se planteó la interrogante de producir esta proteína en un sistema no peligroso. En la década de los 80's se desarrollaron herramientas que permitieron cortar y pegar fragmentos de ácidos nucleicos (DNA), la tecnología de DNA recombinante. Entonces, una vez identificado el antígeno que podía ser utilizado como subunidad para la vacuna, fue posible aislar el gen que lo codificaba para producirlo en otra especie que no representara ningún peligro, como una proteína antigénica, y poder finalmente generar una respuesta primaria. El microorganismo inofensivo produciría esta proteína en el laboratorio, así no era necesario mantener algún tipo de contacto con el patógeno, ni siquiera durante la producción de la vacuna, para ello se utilizaron microorganismos como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y levaduras, ya que eran fáciles de crecer (Makela, 2000).

Utilizando esta estrategia en 1986 surge la primer vacuna recombinante, fruto de la producción en levaduras del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (McAleer et al, 1992).

La tecnología de las vacunas recombinantes se divide en 2 tipos, en las de tipo I la proteína antigénica se produce como se mencionó anteriormente y una vez que los microorganismos no patógenos han producido una gran cantidad de la proteína

antigénica, esta es purificada y utilizada directamente como vacuna. Las vacunas recombinantes de tipo II o también llamadas de gen deletado consisten en la delección de uno o varios genes asociados a la patogenicidad del microorganismo, para que este no pueda causar la enfermedad pero sí pueda retener su capacidad de estimular al sistema inmunológico.

### **2.1.5. Vacunas génicas.**

Las vacunas génicas son también llamadas vacunas de DNA y consisten en la inoculación de una secuencia génica exógena a la célula, clonada en un plásmido o vector de expresión, que codifica para una molécula antigénica de un patógeno específico (Pachuk et al, 2000) como virus, bacterias, parásitos, hongos, alérgenos, y tumores, los cuales han sido usados exitosamente para inducir respuestas inmunes en especies animales desde ratones hasta humanos (Liu y Ulmer, 2000). Debido a que contienen solamente gen(es) específico(s) del organismo patógeno, estos no pueden causar la enfermedad o volver a ser virulentos, no pueden replicarse y no son difundidos en el ambiente (Tecnología de las vacunas, 1998). Este tipo de vacunas hizo su aparición en la década de los 90's.

Las vacunas de DNA se empezaron a desarrollar a partir de la observación de Wolff y colaboradores en 1990, de que la inyección intramuscular de un plásmido de DNA desnudo que contenía un gen reportero, resultaba en la expresión del gen *in vivo* (Wolff et al, 1990).



En ese tiempo, se buscaba mejorar la eficacia de las vacunas anteriores y se requería un nuevo tipo de vacuna que generara mejores respuestas inmunes protectoras (Donnelly et al, 1995). En 1993 se comprobó la eficacia protectora de la inmunización con un DNA que codificaba una proteína viral, fueron inmunizados ratones con un plásmido de DNA que codificaba proteínas del virus humano de la Influenza tipo A, desarrollando una respuesta inmunológica tanto humoral como celular (Ulmer et al, 1993). Desde la publicación de este artículo se demostró la eficacia de las vacunas de DNA para generar respuestas inmunes contra varios antígenos derivados de patógenos, como el Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV) (Wang et al, 1993), Herpesvirus bovino (Cox et al, 1993), Malaria (Sedegah et al, 1994), tuberculosis (Huygen et al, 1995), etc.

Algunas de las ventajas de las vacunas de DNA es que son muy estables y fácil de manufacturar. La persistencia duradera del plásmido y la síntesis prolongada de bajas dosis de antígeno imposibilitan la inducción de una tolerancia a altas dosis y favorecen la generación de células de memoria. La eliminación de proteínas contaminantes en la preparación del plásmido previene efectos colaterales como reacciones alérgicas. Además una vacuna de DNA puede inducir respuestas inmunes tanto humoral como celular (Bona, 2002).

Actualmente existe una gran cantidad de vacunas de DNA probándose en animales y humanos, como es el caso de la vacuna contra el virus de necrosis hematopoyética en truchas (Anderson et al, 1996), contra el virus de la rabia en ratones (Xiang et al, 1994), polyoma virus en hámsters (Israel et al, 1979), virus de la hepatitis en chimpancés (Will et al, 1982). En humanos se prueban vacunas

contra la Hepatitis B (Tacket et al, 1999), Influenza (Ulmer et al, 1993), Malaria (Wang et al, 1998), *Mycobacterium tuberculosis* (Morris et al, 2000), HIV (Stern et al, 2000; MacGregor et al, 1998), entre otras.

## **2.2. Activación Inmune mediada por vacunas.**

De manera general, las vacunas activan al sistema inmune de acuerdo a las siguientes características. La inducción de una respuesta inmune humoral depende del tipo de proteína codificada por el gen foráneo. Mientras que una proteína llevando epítopes reconocidos por una célula B inducirá la síntesis de anticuerpos, una proteína que porte epítopes para células T CD8 induce una respuesta de Linfocitos T Citotóxicos (CTL). En el caso de una respuesta inmune humoral, las células B pueden reconocer epítopes lineales o conformacionales en la superficie de antígenos secretados por células transfectadas, en suspensión. En contraste, en el caso de células T CD8, los péptidos requeridos para activación de precursores CTL son generados por la vía endógena, y los complejos péptido-Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC-I) translocados en la membrana de la célula infectada, son reconocidos por los linfocitos CD8 citotóxicos.

Por otro lado, las células T CD4 son estimuladas por Células Presentadoras de Antígenos (APC's) transfectadas in vivo, las cuales sintetizan la proteína, la procesan y presentan los péptidos en asociación con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC-II) a las células T CD4 (Bona, 2002).

### **2.2.1. Características de los anticuerpos.**

Los anticuerpos son moléculas de peso molecular aproximado de 150 kDa, pertenecientes al grupo de las inmunoglobulinas (Ig). Son proteínas capaces de reconocer antígenos. La capacidad de reconocimiento de un anticuerpo radica en las secuencias variables de sus cadenas protéicas, generadas por recombinación de una serie de "cassettes génicos" en el proceso de producción de los linfocitos B y su maduración. La combinatoria de estas secuencias de DNA puede producir más de un billón de secuencias protéicas diferentes. Esta información es almacenada en el 'pool' de linfocitos B presentes en nuestro tejido linfático. (William, 1993). La estructura básica de un anticuerpo está formada por dos cadenas protéicas pesadas y dos ligeras, unidas por puentes disulfuro. Las cadenas pesadas son esencialmente de 5 tipos diferentes: mu, delta, gamma, epsilon y alfa. Según la cadena pesada que use el anticuerpo se define su clase o isotipo: si posee cadenas mu el anticuerpo se denomina inmunoglobulina M o IgM; si posee delta, se llama IgD; si posee gamma, IgG; si posee alfa, IgA y si posee epsilon, IgE (William, 1993). Todas las clases de inmunoglobulinas están presentes en la sangre, pero la inmunoglobulina G (IgG) es la clase dominante y además es una proteína sérica importante. Los anticuerpos IgM se inducen en las primeras fases de la respuesta inmunitaria y son también abundantes en sangre, no en órganos ni en tejidos; los IgA se segregan en las áreas recubiertas por epitelio mucoso, en el sudor y en la saliva.

La inmunoglobulina A es el isotipo responsable en conferir inmunidad protectora a las membranas mucosas que se encuentran en los tractos intestinal, respiratorio y urogenital. La IgA actúa neutralizando bacterias y virus externos que entran al cuerpo por estas vías (Switzer y Garrity, 1999). Debido a la gran afinidad que posee por los antígenos de superficie en este tipo de patógenos, esta inmunoglobulina se une a ellos, previene su adhesión y subsecuente infección a las células epiteliales que revisten estas membranas. La IgA funciona principalmente como un dímero en estas áreas del cuerpo, aunque se han encontrado muy bajos niveles de la forma monomérica de IgA en el límite de fluidos vasculares. La inhibición de la adherencia microbiana es un paso crítico inicial para la protección del hospedero y es mediado por mecanismos específicos y no específicos. Un mecanismo no específico que inhibe la adherencia microbiana es la presencia de cadenas de carbohidratos en la molécula de IgAs que se une a la bacteria u otros antígenos (Davin et al, 1991).

La inmunoglobulina G es el isotipo más abundante en la sangre, ofrece protección a través de la opsonización del agente o patógeno invasor. Después de que la IgG se une al antígeno, puede inducir a los macrófagos, neutrófilos y otros fagocitos a fagocitarlos y destruirlos. Este proceso ocurre después de que el macrófago u otra célula se une al complejo antígeno-anticuerpo a través de los receptores de IgG. La IgG es el principal isotipo de inmunoglobulinas, inducidas por la repetida introducción de un antígeno extraño al torrente sanguíneo, y generalmente presenta la más alta afinidad intrínseca de unión a antígenos (Switzer y Garrity, 1999).

### **2.2.2. Funciones de los Anticuerpos.**

La función esencial del sistema inmune es buscar y destruir sustancias extrañas en el cuerpo, esto es realizado en muchas formas diferentes. Los anticuerpos ejecutan esta tarea de diferentes formas, como la neutralización de toxinas en la que anticuerpos específicos para toxinas bacterianas se unen a los antígenos inactivándolos y promoviendo la eliminación de complejos antígeno-anticuerpo por la vía del sistema retículoendotelial. En la opsonización los anticuerpos pueden cubrir a la bacterias, así promueven su paso por los macrófagos, los cuales tienen receptores para ciertas clases de anticuerpos y al unirse a los macrófagos por estos receptores facilitan la fagocitosis de los antígenos cubiertos. En la activación del Complemento, ciertas clases de anticuerpos pueden activar la cascada del complemento cuando están formando un complejo con el antígeno, si el epítipo está en la superficie de una célula como en una bacteria, el complemento activado puede lisarla. La clase principal de anticuerpos, las IgG, se unen a través de sus receptores para Fc, a una subclase de células NK que expresan receptores para ellos, las células NK armadas con anticuerpos se unen a la célula blanco, ya sea una bacteria o una célula tumoral, y las destruyen con citotoxinas; a esta función biológica de los anticuerpos se le denomina citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Finalmente, en la neutralización de virus, los anticuerpos específicos para epítipes en la superficie de un virus, puede bloquear la unión del virus a la célula blanco, particularmente si los anticuerpos se unen o se acercan al sitio de unión en el virus (Goodman, 1991). Se ha visto que los anticuerpos IgA secretorios

son efectivos en la neutralización de virus en diferentes pasos del proceso infeccioso (Armstrong y Dimmock, 1992), así como en limitar la inhibición de la fagocitosis, actividad bactericida, y quimiotaxis por neutrófilos, monocitos y macrófagos (Wolf et al, 1994).

La infección viral de la célula blanco está mediada por receptores que permiten el ingreso del material viral, la existencia de anticuerpos específicos para la región del virus que interactúa con el receptor interfiere con este proceso, estos anticuerpos pueden aparecer entre los 5-10 días después de la penetración del virus al cuerpo, formando un complejo inmune antígeno-anticuerpo en la fase de viremia primaria (<http://www.facmed.unam.mx>) la existencia de anticuerpos neutralizantes protege así a la célula de la infección viral.

### **2.3. Adyuvantes.**

En mucosas, la respuesta inmune a muchos antígenos solubles administrados por la ruta oral ha sido débil y ha requerido dosis mayores y frecuentes del antígeno, para utilizar la practicidad de la inmunización oral y su capacidad específica para inducir respuestas inmunes en superficies mucosas, existe una gran necesidad de encontrar adyuvantes poderosos que puedan mejorar la inmunogenicidad y facilitar la construcción de vacunas orales efectivas (Hörnquist et al, 1994).

La palabra adyuvante viene del latín *adjuvare*, que significa ayudar y es una sustancia que utilizada en combinación con un antígeno específico, produce

mayor inmunidad que el antígeno solo (Ramon, 1926). Existen al menos 4 principales fuentes de donde se extraen adyuvantes como la botánica (saponina o extracto de glucano), la química (sales de aluminio), citocinas y hormonas (interleucina 2, dihidroepiandrosterona), y la bacteriana en la que se incluyen la enterotoxina termolábil (subunidad B) y la toxina colérica (subunidad B) (Audibert y Lise, 1993). El adyuvante en mucosas más potente para esta vía identificado, es la toxina del cólera (CT) (Hörnquist et al, 1994).

Los adyuvantes han sido utilizados para aumentar la respuesta inmune a antígenos desde hace más de 70 años. Ramon fue el primero en demostrar que era posible incrementar los niveles de la antitoxina de difteria o tétanos, por la adición de migajas de pan, agar, tapioca, almidón, lecitina, o saponina a las vacunas (Ramon, 1925).

Los adyuvantes se administraban comúnmente por vía parenteral, sin embargo por el uso de agujas que podían estar infectadas, se vio la necesidad de otro tipo de ruta más fácil y más segura como lo es la oral, y que además este fuera tolerado por el organismo inmunizado. Los adyuvantes que son tolerados y que pueden potenciar vacunas juegan un papel importante en la inmunización por mucosas. Algunos de los más prometedores ya sea completados o cercanos a pruebas clínicas incluyen microesferas compuestas de copolímeros de ácidos láctico y glicólico (Tacket et al, 1994), proteosomas (Lowell, 1997), liposomas (Chaicumpa et al, 1998), secuencias repetidas de CpG's (Moldoveanu et al, 1998), y Partículas Pseudo-Virales (VLP's) (Cryz y Gluck, 1998).

Actualmente se están haciendo pruebas en humanos para comparar la eficacia y potenciación de los adyuvantes, ejemplo de ello es una vacuna contra el HIV que

se encuentra en Fase I, en la cual se comparan varios tipos de adyuvantes (Keefer et al, 1997), también vacunas contra la malaria han hecho uso de los adyuvantes como el aluminio y la toxina A no patógena de *Pseudomonas aeruginosa* (Fries et al, 1992).

### **2.3.1. Toxina del Cólera.**

La toxina del cólera y la enterotoxina de *E. coli*, son adyuvantes poderosos que aumentan la respuesta de anticuerpos sistémicos y locales cuando son coadministrados con un antígeno, particularmente cuando son liberados por mucosas (Spangler, 1992; Kotloff et al, 2001).

La toxina colérica es una proteína heterohexamérica, producida en el lumen intestinal por la bacteria *Vibrio cholerae*. Consta de una subunidad A tóxica, separada del plano del anillo formado por 5 pequeñas subunidades B idénticas no tóxicas (Figura 1). El pentámero B se une al receptor GM1 (Gangliósido) en la membrana de las células del epitelio intestinal o cualquier otra célula que contenga GM1, incluyendo células de piel, epitelio mucoso, linfocitos, y células dendríticas (Anjuère et al, 2003). La subunidad A es translocada dentro de la célula donde puede ribosilar a la subunidad B<sub>5</sub> con su actividad de adenilato ciclasa la cual convierte ATP a AMP cíclico (cAMP) en la célula afectada (Spangler, 1992), este incremento en la producción de cAMP causa diarrea y pérdida de fluidos por inhibición de la absorción de cloruro de sodio y estimula la secreción de Cl<sup>-</sup>, a esta



severa diarrea causada por la infección de la bacteria se le conoce como cólera (Holmgren, 1981). Se ha visto que únicamente el pentámero B, no tiene actividad tóxica.

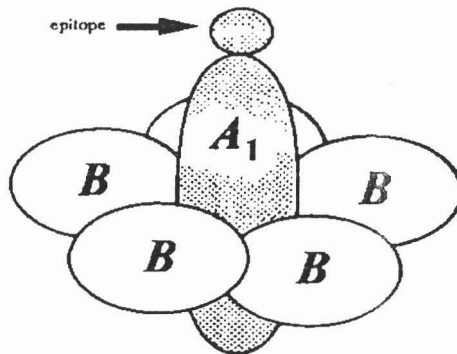


Figura 1. Representación esquemática de la molécula final derivada de las subunidades recombinantes A y B donde la subunidad A porta el epítipo agregado. Se indican la subunidad B y la región A1 de la subunidad A. La unión del epítipo toma lugar en el extremo amino de esta última región.

La toxina colérica (CT) y su análoga enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* tienen varios efectos inmunomoduladores, que podrían explicar su acción adyuvante para estimular la síntesis de IgA secretora, después de la inmunización oral. En un modelo murino experimental esos efectos incluyen: la presentación más eficiente de los antígenos por los macrófagos y enterocitos, esta estimulación de células presentadoras de antígenos (APC) podría ser un mecanismo importante involucrado en la función adyuvante de CT (Hörnquist et al, 1994).

Se ha demostrado que la CT y la subunidad atóxica B (CTB) tienen la propiedad de facilitar la respuesta inmunitaria de la mucosa ante la presencia de varias

epítopes o antígenos adyuvantes que pudieran servir como vehículo para inducir una respuesta específica de tipo IgA en el intestino, glándulas salivales, tracto respiratorio y mucosa genital, después de una inmunización oral, así como también una respuesta de anticuerpos IgG (Anjuère et al, 2003; Hörnquist et al, 1994).

Diversos estudios corroboran el uso de CTB como un potente estimulador de la respuesta inmune de las mucosas gástrica y genital, cuando ha sido liberada por vías intranasal, oral, vaginal y rectal (Johansson et al, 1998; Rudin et al, 1999), en sus formas sintética o purificada. En humanos se ha probado la utilización de CTB sola o como adyuvante en vacunas contra el cólera (Lycke y Holmgren, 1986), *Streptococo B III* (Ckerzinsky et al, 1989), Influenza (Chen y Strober, 1990) y en distintas especies de *Helicobacter*, entre otras.

### **2.3.2. Virus del Papiloma Humano.**

Los Virus del Papiloma Humano (HPV) poseen DNA de doble cadena, clasificados dentro del grupo de los *Papovaviridae*, junto con los poliomavirus y el virus SV40. Son epiteliotrópicos y su genoma es de aproximadamente 8000 pares de bases (pb) de longitud, con un peso molecular de  $5 \times 10^6$  Daltons, asociado con histonas celulares para formar una sustancia parecida a la cromatina. Presentan una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros con un diámetro de 52 a 55 nm rodeando al genoma de DNA y conformada por 2 proteínas que son

sintetizadas por los genes L1 y L2 (L=Late). L1 es la proteína mayoritaria de la cápside, con un peso molecular de aproximadamente 55 kDa, mientras que L2 tiene un peso molecular de 75 kDa aprox. (Koutsky, 1997).

Los virus del papiloma se encuentran presentes en los vertebrados superiores y son especie-específicos (Broker y Botchan, 1986). Todos los Virus del Papiloma tienen tropismo por las células del epitelio escamoso, se ha reportado que en la capa basal, la integrina  $\alpha_6$  (receptor membranal de matriz extracelular) sirve como receptor del HPV 16 (Yoon et al, 2001; Evander et al, 1997). Esta glicoproteína se expresa únicamente en la capa basal de las células del epitelio escamoso estratificado, que es considerado el sitio de infección productiva de este virus.

Los tipos que infectan a humanos inducen verrugas que se presentan en muchos lugares y de muy distintas maneras tanto morfológica como histológicamente. La infección por este virus necesita de un acceso directo a las células basales expuestas, tal vez por una lesión del epitelio. Las zonas de transformación entre los epitelios columnar y escamoso de las mucosas nasal, faríngea y cervical, son susceptibles a infectarse con estos virus (Broker y Botchan, 1986).

Desde los 70's se ha podido aislar DNA de HPV's tipos 16 y 18, de las biopsias de Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) (Zur-Hausen y de Villiers, 1994) y actualmente se ha establecido que la infección de otros tipos de HPV, como el 31, 33, 39, 45, 52, 58, 69, además de los anteriores (Zur-Hausen, 2000), es el mayor factor de riesgo

para el desarrollo de cáncer en el tracto anogenital, y es mucho más notable en los tumores del cérvix uterino (Gissmann et al, 2001), por ello estos tipos virales son conocidos como HPV's de alto riesgo, siendo el tipo 16 el más común en México.

### **2.3.3. Características de HPV 16.**

El genoma de este virus está organizado en tres regiones principales: dos regiones que codifican para proteínas tempranas E y tardías L, y una región larga de control (LCR) no codificante (Park et al, 1995). La región temprana E se encuentra ubicada río debajo de la LCR y contiene 6 ORF's (Open Reading Frame) denominados E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (Park et al, 1995) (Figuras 2 y 3).

El gen E1 es el más grande del genoma viral, relativamente bien conservado, la proteína que codifica presenta similitudes estructurales con el antígeno T grande de los poliomavirus (Clertant y Seif, 1984). Esta proteína interviene directamente en la replicación del DNA viral y también en la estimulación de la actividad transcripcional de E2 (Huges y Romanos, 1993).

El gen E2 codifica para una proteína que se une en forma de dímero al DNA viral, esta proteína interviene en la expresión y represión de los genes virales (Fields Virology, 1996), actúa como represor de la transcripción y una de sus principales funciones en la replicación es dirigir a E1 hacia el origen de la replicación (Piccini et al, 1995).

El gen E4 se localiza en la región temprana, aunque se expresa como un gen tardío con un papel en la infección productiva, interrumpiendo el proceso normal de diferenciación a favor de la maduración del virión. La proteína E4 se encuentra principalmente en las capas de células diferenciadas del epitelio (Breirburd et al, 1987).

El gen E5 está altamente conservado en todos los virus del papiloma, la proteína que codifica transforma indirectamente la célula infectada, al alterar la actividad de las proteínas de la membrana involucradas en la proliferación celular. Es posible que esta proteína participe en el proceso de iniciación carcinogénica (Fields Virology, 1996).

El gen E6 codifica para una proteína que captura e inactiva al gen supresor de tumores p53, favoreciendo su degradación (Werness et al, 1990), por medio de la vía de la ubiquitina, causando así la alteración de su función supresora y la ausencia de regulación del ciclo celular, lo que a su vez no permite la reparación del DNA antes de iniciar un nuevo ciclo de replicación del DNA (Fields Virology, 1996).

El gen E7 codifica para una proteína que es capaz de unirse al producto génico del gen RB (Retinoblastoma), que es un gen supresor de tumores (Dyson et al, 1989), la proteína E7 se une a pRB, lo que conduce a su inactivación y la consecuente progresión del ciclo celular a la fase S (Cobrinik et al, 1992).

La región tardía L se encuentra ubicada río abajo de la LCR y contiene solo 2 ORF's denominados L1 y L2 (Figuras 2 y 3), estos genes se transcriben y traducen exclusivamente en las células más diferenciadas del epitelio, su principal

función es conformar la cápside de los viriones maduros en la infección productiva (Fields Virology, 1996).

El gen L1 codifica para una proteína que es el componente principal de la cápside viral y representa cerca del 95% del peso total. La proteína L1 es la más antigénica y es capaz de autoensamblarse, esto último es lo que se ha aprovechado para producir partículas pseudo virales (VLP's) (Hagensee et al, 1993).

El gen L2 codifica para una proteína que es el componente menor de la cápside viral, presenta la capacidad de unirse al DNA, no es capaz de autoensamblarse y es muy poco conservada entre los virus del papiloma (Fields Virology, 1996).

Debido a que las proteínas L1 y L2 son antigénicas, y ya que se encuentran formando la cápside del virus, son las primeras en ser reconocidas como antígenos por el sistema inmunológico del organismo infectado, en el que se desencadena una respuesta primaria basada en anticuerpos de tipo IgA e IgG.

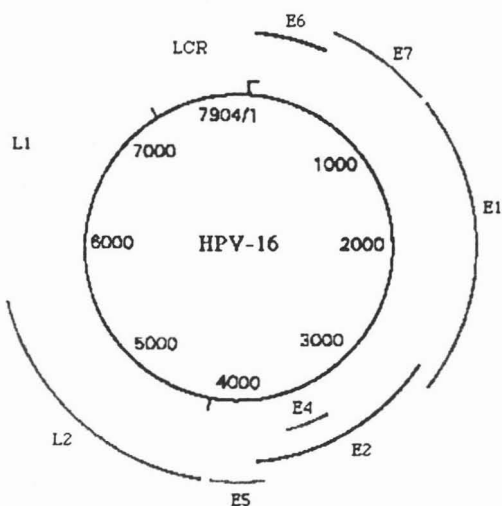


Figura 2. Genoma del Virus del Papiloma Humano tipo 16.

La expresión de los genes tempranos puede ser detectada en las células del epitelio escamoso (por hibridación *in situ*), sin embargo, la expresión de los genes tardíos y de los estructurales (entre otros) está restringida a las células diferenciadas de la epidermis, lo cual implica un vínculo entre la diferenciación celular y la expresión de los genes virales.

La infección por HPV 16 puede permanecer latente, o desarrollarse completamente en una infección productiva, debido a una variedad de factores que aún no son entendidos.

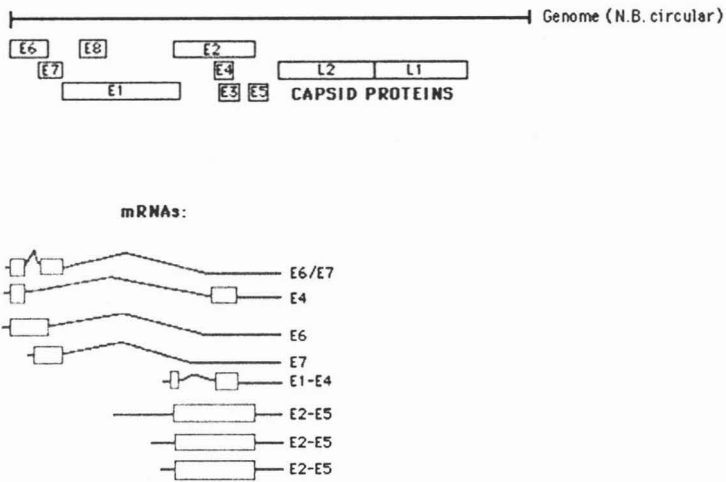


Figura 3. Representación lineal del genoma del Virus del Papiloma Humano.

### 2.3.4. Epidemiología.

En muchos países el HPV es considerado como la infección más común transmitida sexualmente, mientras que el cáncer cervical es considerado el segundo tipo de cáncer más común de los que aquejan a la mujer en el mundo (Bosch y Muñoz, 2002).

Observaciones hechas por Rigoni-Stern y publicadas en 1842, mostraron una incidencia muy alta de Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU) en prostitutas, comparada con las monjas, esto marcó la primera contribución a los factores etiológicos en el cáncer genital humano.



El CaCU es uno de los tipos de cáncer de mayor frecuencia en mujeres de países en vías de desarrollo y causa una gran cantidad de muertes debido a la falta de una detección temprana del mismo (Fields Virology, 1996).

El CaCU es una de las principales causas de muerte en mujeres mexicanas, cobrando más de 4,000 muertes por año según datos de la Secretaría de Salud, a pesar de haberse implementado un programa de detección oportuna del cáncer que incluyen los estudios de Papanicolaou y Colposcopia. Se ha establecido que este padecimiento está asociado con la infección por HPV's de alto riesgo (Bosch y Muñoz, 2002), siendo el tipo 16 el que con mayor frecuencia infecta mujeres en México.

Debido al número de muertes, es de gran importancia construir una vacuna de tipo profiláctico que proteja contra la infección primaria por HPV 16, impidiendo la introducción del genoma viral y su inserción en el genoma celular del cérvix, para así lograr evitar el desarrollo a largo plazo del CaCU, y que además no represente un problema de costo y complejidad en la elaboración de la misma.

Como ya se ha demostrado, la infección por HPV es considerada como un agente causal del CaCU (Bosch y Muñoz, 2002). Uno de los grandes retos de los investigadores es crear una vacuna ya sea terapéutica y preferentemente profiláctica, contra este virus. Las vacunas profilácticas podrían prevenir la infección y las vacunas terapéuticas podrían destruir las células neoplásicas infectadas por HPV (Bright et al, 1995).

Se sabe que algunos antígenos provenientes de virus como los HPV's, EBV (Virus de Epstein-Barr), HTLV-1 (Virus de Linfocitos T Humanos), Hepatitis B, etc., son detectados por el sistema inmune que produce una respuesta mediada por anticuerpos y células T (Stern et al, 2000).

### **2.3.5. Vacunas.**

Existen pruebas experimentales de que la inmunización de animales (vacas, conejos o perros) con proteínas estructurales o partículas pseudovirales (VLP's) de los papilomavirus animales respectivos, induce una inmunidad humoral protectora contra infecciones de los papilomavirus. Las VLP's son obtenidas por expresión de la proteína estructural principal vía vectores recombinantes y son eficientes en prevenir el desarrollo de los papilomas característicos después del reto de los animales con partículas virales infecciosas. El desarrollo de vacunas profilácticas basadas en VLP's contra infecciones de papilomavirus genitales (tipos 11 y 16), es actualmente seguida por compañías farmacéuticas o por científicos del NIH (Gissmann et al, 2001), ya que es una preocupación en muchos países como Finlandia, debido al aumento en el número de mujeres jóvenes infectadas con este virus, por lo que se necesita cumplir rápidamente con los requisitos para poner en prueba las vacunas existentes (Paavonen et al, 2000).

Vacunas profilácticas basadas en la proteína L1 en VLP's están actualmente en pruebas clínicas en humanos (Lowy y Frazer, 2003).

Actualmente se encuentra en Fase I de prueba una vacuna basada en VLP's contra HPV16 y se han obtenido resultados que demuestran la eficacia de la vacuna para poder seguir con otras pruebas (Brown et al, 2004). Investigadores han encontrado que esta vacuna da lugar a una fuerte respuesta inmune, y esta respuesta fue vista en el segundo mes después de la inmunización, en todos los casos (Harro y Lowy, 2001).

En Inglaterra, Australia y Holanda, se están llevando a cabo tres protocolos de vacunas terapéuticas para estimular los Linfocitos T Citotóxicos en pacientes con cáncer cervical avanzado, utilizando el virus de la vaccinia como vector con E6 y E7, la proteína E7 fusionada con una proteína bacteriana y péptidos específicos de E7 (Lin et al, 1996).

También existe evidencia de pruebas en fase III y IV de vacunas contra HPV16 en Estonia y los países Nórdicos, en mujeres de 15 años (Lehtinen et al, 2000).

Los VLP's quiméricos (CVLP's) construidos por fusión de las secuencias de E7 de HPV 16, en el extremo C-terminal del gen L1, constituyen la primera generación de vacunas contra HPV preventivas y terapéuticas (Osen et al, 2000).

El éxito de estas vacunas podría unirse a la vacuna contra la Hepatitis B en la batalla contra los tipos de cáncer que atacan al hombre (Hilleman, 2000).

### **2.3.6. Vacuna de DNA.**

En nuestro laboratorio se ha diseñado y probado una vacuna génica profiláctica contra la infección por el HPV 16, la cual está compuesta del gen L1 de este tipo

viral y se demostró que es capaz de generar una respuesta inmune humoral y citotóxica (Rocha-Zavaleta et al, 2002). Esta vacuna fue probada en ratones y demostró que era capaz de producir anticuerpos de tipo IgA secretorios (sIgA) en el área cervical, al igual que una respuesta mediada por Linfocitos T citotóxicos, lográndose una protección parcial contra la infección por el virus.

A partir de estas observaciones se llegó a la conclusión de que era necesario incrementar la respuesta inmune inducida por la vacuna génica, tanto a nivel humoral como celular. Por lo tanto, en el presente proyecto se planteó investigar la utilidad de la secuencia codificadora de la subunidad B de la toxina del cólera como un adyuvante para la vacuna génica contra el HPV16.

### **3.1 OBJETIVO GENERAL.**

**Determinar la capacidad adyuvante de la secuencia codificadora de la subunidad B de la toxina del cólera, en un modelo de vacuna génica.**

### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- **3.2.1.** Aislamiento del gen L1 del HPV16 a partir del DNA viral prototipo contenido en el vector puC19, mediante el método de PCR.
- **3.2.2.** Clonación del gen L1 del HPV16 dentro del vector pcDNA3 para obtener el plásmido pHPV16L1.
- **3.2.3.** Subclonación del gen L1 dentro del plásmido pctxB, para obtener el plásmido quimérico pctxB/L1.
- **3.2.4.** Producción de plásmidos para ser usados como vacunas, por fermentación de las bacterias transformadas.
- **3.2.5.** Extracción y purificación del DNA plasmídico.
- **3.2.6.** Vacunar ratones con los plásmidos pHPV16L1, pctxB y pctxB/16L1.
- **3.2.7.** Obtención de secreciones cervicales, suero y extractos fecales de los animales vacunados.
- **3.2.8.** Evaluar la presencia de anticuerpos por el método de ELISA.

#### **4. HIPÓTESIS.**

Dado que la subunidad B de la toxina del cólera es un adyuvante en la generación de anticuerpos inducidos por diversas vacunas, en el presente trabajo se propone que el uso de la secuencia génica que codifica para esta subunidad puede servir como adyuvante de la respuesta humoral mediada por una vacuna de DNA contra el Virus del Papiloma Humano tipo 16.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **5.1. Electroforesis en Geles de Agarosa.**

La electroforesis de muestras de DNA se llevó a cabo utilizando geles de agarosa de aproximadamente 1 cm de grosor, los cuales fueron preparados disolviendo la concentración requerida de agarosa en buffer TBE más 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de Bromuro de Etidio (Apéndice A). Para disolver la agarosa, se calentó la mezcla en un horno de microondas por aproximadamente 3 minutos o hasta que la agarosa quedara completamente disuelta. Se dejó enfriar, se vació en el molde de la cámara de electroforesis y se colocó el peine para formar los pozos. Las muestras de DNA a analizar se diluyeron con el buffer de carga (Apéndice A), utilizando como marcador de peso molecular 4  $\mu\text{l}$  de 1Kb Plus (Gibco). La electroforesis se corrió a 120 v hasta que el colorante delantero migrara poco más del 75% de la longitud del gel, se utilizó TBE como buffer de corrida.

La presencia de las bandas de DNA fue detectada utilizando un transiluminador, y fotografiada en un documentador de geles (Foto Analyst Visionary Fotodyne).

### **5.2. Digestión Enzimática de DNA.**

El DNA fue digerido con endonucleasas de restricción diluyendo 1:1 en su buffer correspondiente 10x, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las

concentraciones se planearon tomando en cuenta que 1U de enzima digiere 1  $\mu\text{g}$  de DNA en 50  $\mu\text{l}$  a 37 °C. A cada reacción se agregó 1/10 del volumen total, de Albúmina de Suero Bovino (BSA) 1 mg/ml. Las digestiones fueron llevadas a cabo a 37 °C por 1 hora. El material digerido fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Apéndice A).

### **5.3. Ligación de Fragmentos de Restricción de DNA en Vectores de Expresión.**

Previo a la ligación del inserto de DNA en el vector de expresión, los vectores utilizados fueron preparados por digestión enzimática, en las condiciones descritas en el párrafo anterior.

La digestión de 300 ng del vector fue realizada en un volumen de 60  $\mu\text{l}$ . Se analizaron alícuotas de 2  $\mu\text{l}$  de las digestiones en geles de agarosa, junto con material no digerido para evaluar el alcance de la digestión. Al vector totalmente digerido se le adicionaron 2  $\mu\text{l}$  de fosfatasa alcalina (calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP) con su respectivo buffer 10x, esta mezcla fue incubada a 37°C por 30 minutos. La CIAP remueve los residuos fosfato terminal 5' de los brazos que resultan de la digestión, para prevenir la ligación entre ellos mismos y la formación de dímeros.

El vector digerido fue purificado de la restricción enzimática y la desfosforilación (CIAP) por extracción, primero con fenol:cloroformo y luego con cloroformo:alcohol



isoamílico, seguido de una precipitación por etanol (sección 5.5). El pelet resultante fue disuelto en 20  $\mu$ l de buffer TE pH 8.0 (Apéndice A).

La ligación del vector y el inserto de DNA fue realizada en 60  $\mu$ l con tres ratios molares 1:1, 1:3 y 1:10 (vector:inserto), utilizando como base 300 ng de vector digerido. Para la reacción de ligación se mezclaron 2U de T4 DNA ligasa, 4  $\mu$ l de buffer 5x para T4 DNA ligasa, agua destilada estéril y se mezclaron con el vector y el inserto de DNA, la reacción se incubó toda la noche en un baño con agua a 16°C . Estas ligaciones fueron utilizadas para transformar bacterias *E. coli* competentes (sección 3.6.).

#### **5.4. Recuperación de DNA de Geles de Agarosa por Electroelusión.**

20 a 30  $\mu$ g de DNA fueron digeridos y separados en un gel de agarosa como se describió en las secciones 3.1. y 3.2. Las bandas de DNA de interés fueron localizadas y cortadas del gel bajo iluminación UV, utilizando un bisturí estéril, cuidando que el corte fuera lo más delgado posible para reducir la cantidad de contaminación con polisacáridos de la agarosa, del DNA.

Las membranas de diálisis fueron preparadas calentando por 10 minutos en un volumen considerable de bicarbonato de sodio al 2% (w/w) y EDTA 1mM (pH 8.0), Las membranas fueron enfriadas y almacenadas a 4°C. Cada membrana de aproximadamente 4 cm fue sellada por un extremo con un clip para diálisis, y

llenada con buffer de elusión (TAE) 1x (Apéndice A). La rebanada de agarosa con la banda de DNA se introdujo a la membrana. Se removió gran parte del buffer y el otro extremo de la membrana se selló con un clip para diálisis. La membrana de diálisis fue transferida a la cámara de electroforesis. La electroelusión del DNA se llevó a cabo pasando una corriente eléctrica a través de la membrana, de 150 v por 20 minutos en Buffer TE (Apéndice A). Después de este tiempo, el DNA fue extraído de la membrana y purificado por precipitación en fenol:cloroformo, seguido de cloroformo:alcohol isoamílico y finalmente con etanol (sección 5.5.)

### **5.5. Purificación del DNA por Fenol:Cloroformo y Extracción por Precipitación con Etanol (EtOH).**

Un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1) fue adicionado a la muestra de DNA en un tubo de propileno (ependorf), mezclando en vórtex hasta formar una emulsión, se centrifugó a 13,500 rpm por 5 minutos en una microcentrífuga. El ácido nucleico contenido en la fase acuosa forma la fase superior, mientras que la fase orgánica forma una fase inferior amarilla, el color de esta fase se debe a la presencia de dihidrohiquinolina. La fase acuosa fue transferida a un tubo eppendorf nuevo, y se adicionó un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Las fases fueron mezcladas en vórtex y centrifugadas a 13,500 rpm por 10 segundos. El DNA contenido en la fase acuosa superior fue transferido a un tubo eppendorf nuevo. El DNA fue recuperado por precipitación con etanol, mezclándolo con 2 volúmenes de etanol al 95% y acetato de sodio pH 5.2 en una concentración final

de 0.3 M. Los contenidos del tubo fueron mezclados suavemente por inversión (2 a 3 veces) y congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  por una hora. El DNA fue recuperado por centrifugación a 13,500 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. El sobrenadante fue desechado y el pellet de DNA resuspendido en Buffer TE.

## **5.6. Transformación de *Escherichia coli* competentes.**

Poco antes de la transformación las bacterias competentes fueron retiradas de su almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$ , descongeladas en hielo y se les aplicaron pequeños golpes hasta formar una suspensión. Se tomaron  $100\ \mu\text{l}$  de bacterias competentes y se combinaron con  $10\ \mu\text{l}$  del DNA ligado vector:inserto (sección 3.3.). Después de incubar las muestras en hielo por 30 minutos, la transformación de células bacterianas fue realizada por un tratamiento de heat-shock de las muestras a  $42^{\circ}\text{C}$  por 90 segundos, seguido de la adición inmediata de  $500\ \mu\text{l}$  de medio LB. Las células fueron después incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora con agitación constante, para permitirles recobrar y expresar el marcador de resistencia a antibiótico codificado por el plásmido (resistencia a ampicilina).

Para probar las bacterias transformadas por selección de bacterias resistentes a antibiótico, se prepararon placas de selección con una solución de agar al 1% (w/v), disuelto en medio LB (apéndice A) y calentada por 5 minutos en un horno de microondas. La solución fue enfriada a  $37^{\circ}\text{C}$  aproximadamente y se adicionaron  $100\ \mu\text{g/ml}$  de ampicilina. El agar fue vaciado en cajas de petri estériles de 90 mm

de diámetro, y guardadas a temperatura ambiente. Las placas fueron inoculadas esparciendo 300  $\mu$ l de bacterias transformadas, después de que el inóculo fue adsorbido, se incubaron en posición invertida a 37°C toda la noche, y transferidas a 4°C.

Las colonias blancas bien definidas, fueron transferidas a tubos estériles con 5 ml de medio LB +Ampicilina (100  $\mu$ g/ml ), e incubadas a 37°C toda la noche con agitación constante. Las colonias que crecieron fueron transferidas a un "master plate", tomando una gota de cada medio conteniendo una colonia, al master plate (vaciado como se describió en el medio LB-agar suplementado con ampicilina). Cada clona fue identificada con un número en el master plate. Después de ser incubado a 37°C toda la noche, el master plate fue sellado con parafilm y almacenado a 4°C. Mientras tanto, los cultivos fueron centrifugados a 13,500 rpm por 10 minutos, se tiró el sobrenadante y los pelets se utilizaron para preparación de DNA plasmídico.

## **5.7. Preparación de DNA plasmídico (Miniprep).**

Los pelets bacterianos fueron resuspendidos en 200  $\mu$ l de solución de glucosa [50mM de glucosa, 25 mM Tris-Cl (pH 8), 10mM EDTA (pH 8)], a la cual se le adicionó lisozima sólida (cubriendo el extremo de una microespátula). Después de incubar en hielo por 5 minutos, se adicionaron 400  $\mu$ l de una solución de NaOH 0.2M / SDS al 1% (w/v), los tubos fueron cerrados y sus contenidos mezclados por inversión rápida 5 veces. Después de una incubación de 5 minutos, se adicionaron

300  $\mu$ l de solución de acetato de potasio 5M (pH 5.1) frío, para precipitar el DNA bacteriano y proteínas, los tubos fueron agitados vigorosamente en repetidas ocasiones hasta dispersar la solución de acetato de potasio a través del lisado bacteriano viscoso. Los tubos fueron incubados en hielo por 10 minutos y centrifugados a 13,500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante conteniendo el plásmido fue transferido a tubos eppendorf nuevos de 1.5 ml, se adicionaron 500  $\mu$ l de isopropanol y se incubaron los tubos en hielo por 10 minutos, se centrifugaron de la manera descrita anteriormente para precipitar el plásmido. Los pelets resultantes fueron secados y resuspendidos en 200  $\mu$ l de buffer TE (pH 8.0), se adicionaron 100  $\mu$ l de acetato de amonio 7.5M, se mezclaron y se incubaron en hielo por 20 minutos para precipitar el RNA. Después de centrifugar los tubos como se describió antes, el DNA fue precipitado del sobrenadante adicionando 600  $\mu$ l de etanol al 95%, e incubando a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Después de centrifugar a 13,500 rpm por 10 minutos, los pelets fueron secados y resuspendidos en 50  $\mu$ l de buffer TE. Se adicionaron 20  $\mu\text{g/ml}$  de RNAsa pancreática libre de DNAsa a cada muestra para digerir el RNA remanente. Las muestras quedaron listas para ser analizadas por restricción enzimática (sección 5.2.).

### **5.8. Preparación de DNA plasmídico (Maxiprep).**

Para obtener los pelets bacterianos se hizo un cultivo, partiendo de los cultivos de tubos de 5 ml de la sección 5.6., y dividiéndolos en matraces con 250 ml de medio

LB + Ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ), se dejaron a 37°C con agitación por 16 a 18 horas. Se centrifugaron a 4000-5000 rpm por 15 minutos (en un rotor GSA). El sobrenadante fue desechado y los pelets se resuspendieron en 10 ml de una solución de glucosa, es decir, el proceso se continuó como se describió anteriormente en la preparación de DNA plasmídico de la sección 3.7., aumentando las cantidades de soluciones y/o reactivos 50 veces, hasta obtener el pelet de DNA plasmídico que fue resuspendido en 500  $\mu\text{l}$  de buffer TE. Se adicionaron 20  $\mu\text{g/ml}$  de RNAsa pancreática libre de DNAsa a cada muestra para digerir el RNA remanente, quedando listo para su posterior cuantificación.

## 5.9. Cuantificación de DNA.

La cuantificación espectrofotométrica del DNA se llevó a cabo haciendo una dilución 1:200 del DNA obtenido anteriormente (secciones 5.7. y 5.8.), es decir, 5  $\mu\text{l}$  de DNA y 995  $\mu\text{l}$  de agua destilada, para obtener un volumen final de 1 ml. De esta dilución se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21D, Milton Roy), para calcular la concentración de DNA en la muestra. Dado que una densidad óptica (OD) de 1 corresponde a aproximadamente 50  $\mu\text{g/ml}$  de DNA bicatenario, la concentración de DNA se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}] (\text{ng}/\mu\text{l}) = (\text{OD a } 260 \text{ nm}) (\text{factor de dilución}) (\text{OD del DNA})$$

Donde:

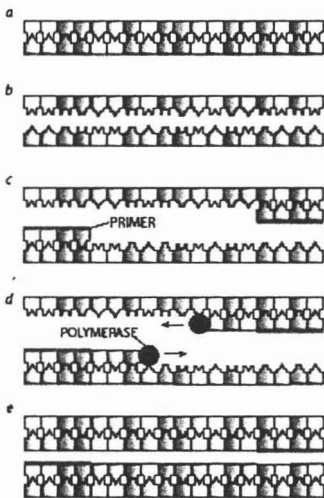
OD = Densidad Óptica

Factor de Dilución= 200

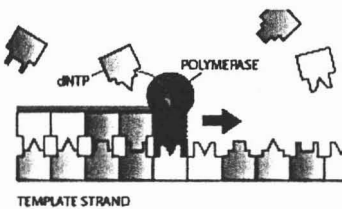
OD del DNA = 50

## 5.10. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Todos los reactivos usados para el aislamiento y amplificación de DNA, fueron comprados a Gibco BRL (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). El DNA



Genómico fue aislado de cultivos de *Vibrio cholerae* biotipo El Tor y usados como template para reacciones de PCR. La secuencia completa que codifica para el polipéptido maduro de la subunidad B de la enterotoxina, fue amplificada usando los siguiente oligonucleótidos: Col Tox F (5' TCA GGC GGC CGC CAT ATG CAC ATG AGG CAC CT 3') Y Col Tox R (5' TCA GTC TAG ATT AAT TTG CCA TAC TAA TTG C 3'). Para facilitar la clonación, se incorporaron sitios de restricción *NotI* y *XbaI* en los primers Col Tox F y Col Tox R, respectivamente. Los primers fueron diseñados para amplificar un fragmento de la posición 187 a la 512 (Lockman y Koper, 1983)



(acceso no. K01170). Los fragmentos amplificados fueron digeridos con *NotI* y *XbaI* para generar extremos cohesivos, e insertados en los sitios *NotI-XbaI* del vector de expresión pCDNA3 (Invitrogene Co., La Jolla, CA), bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (CMV), para generar el plásmido pctxB.



Crecimiento exponencial del DNA blanco

Duplicación del DNA por acción de la enzima Taq DNA polimerasa

Figura 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El gen L1 fue amplificado del genoma de HPV16 tipo silvestre por PCR, usando los oligonucleótidos: EveL1F (5' CGG TAC CTA GTT CCA GGT CTC CAC 3') Y 16L1R (5' CCT CGA GAT ATA CAC AAC CAA ACA AC 3'). Los primers EveL1F y 16L1R amplificaron un fragmento de 1672 pares de bases que contiene la secuencia codificadora completa de L1. Se incorporaron sitios de reconocimiento *KpnI* y *XhoI* en los primers EveL1F y 16L1R, respectivamente. Los fragmentos de L1 amplificados fueron digeridos con *KpnI* y *XhoI* e insertados en los sitios correspondientes dentro del vector de expresión pCDNA3 para construir el plásmido pHPV16L1.



El gen L1 fue también amplificado usando los oligonucleótidos EveL1F y 16L1R'. El uso del primer 16L1R' (5' CGC GGC CGC GCGT TTA GCA GTT GTA GAG 3') permite la amplificación de una secuencia truncada de L1 (1612 pares de bases), que carece de las señales de término natural. Se incorporó un sitio *NotI* dentro de 16L1R'. El fragmento truncado L1 fue subclonado en los sitios *KpnI* - *EcoRV* del plásmido pctxB para generar el plásmido de fusión pctxB/L1.

### **5.11. Secuenciación.**

La integridad del DNA de los insertos L1 y ctxB de todas las construcciones fue corroborada en un secuenciador automático (modelo ABI-PRISM/310/PerKin-Elmer), utilizando 5  $\mu$ l del oligonucleótido Col Tox R (ver sección 3.10.) a una concentración de 4  $\mu$ mol/ $\mu$ l, y 10  $\mu$ l del DNA plasmídico de pctxB, a una concentración final de 50 ng/ $\mu$ l. Para analizar el plásmido pHPV16L1 se utilizó el oligonucleótido del promotor de la polimerasa T7 (5' TTA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'), a una concentración de 4  $\mu$ mol/ $\mu$ l, y 6  $\mu$ l del DNA plasmídico, a una concentración final de 100 ng/ $\mu$ l. El plásmido quimérico pctxB/L1 fue analizado de la forma explicada anteriormente, utilizando los primers Col Tox F, Col Tox R, EveL1F y 16L1R.

## 5.12. Análisis de RNA.

Se inocularon  $1 \times 10^5$  células B16FO (H-2<sup>b</sup>) subcutáneamente, en la espalda de ratones de la cepa C57BL/6 y se monitoreó la formación del tumor. Veinte días después de la inoculación, los tumores fueron transfectados con una inyección de 100  $\mu$ g de los plásmidos pHPV16L1, pctxB y pctxB/L1, solos y con una combinación (cocktail) de 100  $\mu$ g de pHPV16L1+ 100  $\mu$ g de pctxB. Cuarenta y ocho horas después de la inyección de los plásmidos, los ratones fueron sacrificados y se recuperaron los tumores, se obtuvieron 100 mg de muestras tumorales y se homogenizaron en 1 ml de Trizol (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD), usando un homogenizador. El RNA total fue purificado por separación de fenol-cloroformo y precipitado con alcohol isopropílico. Las secuencias específicas de RNA fueron retro-transcritas a cDNA y amplificadas por PCR utilizando el sistema RT-PCR SuperScript™ One-Step™ (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). La secuencia específica del mRNA de HPV16 L1 fue amplificada utilizando los oligonucleótidos EveL1F y 16L1R (sección 3.10.), mientras que la secuencia del mRNA de ctxB fue amplificada con los oligonucleótidos ColTox F y ColTox R (sección 5.10).

## 5.13. Inmunización.

Grupos de 10 ratones hembra de la cepa C57BL/6, de 6 a 8 semanas de edad, fueron vacunados con dos dosis de DNA plasmídico (100  $\mu$ g / 100  $\mu$ l PBS)

separadas por 2 semanas por la vía oral, utilizando una sonda intratraqueal. Los grupos experimentales quedaron constituidos como se muestra en la siguiente tabla:

GRUPO	VACUNACIÓN
1	pHPV16L1
2	pctxB
3	pctxB/L1
4	pHPV16L1 + pctxB
5	pHPV16L1 + 10 µg coltoxB purificada (Sigma)
6	PBS (control negativo)

#### 5.14. Colecta de muestras.

Se colectaron muestras de suero, secreciones cervicales y secreciones fecales en el día 28, post-vacunación.

Los ratones fueron sangrados por punción retro-orbital. El suero fue separado por centrifugación a 12,000 rpm por 15 minutos, inactivado 30 minutos a 56°C y almacenado a -20°C.

Las secreciones cervicales fueron colectadas lavando el tracto genital tres veces con 30 µl de PBS estéril libre de contaminantes. Las secreciones fueron limpiadas de desechos celulares y fragmentos de tejido por centrifugación a 13,000 g por 5 minutos y almacenadas a -70°C.

Las secreciones fecales fueron colectadas y pesadas, el volumen final se ajustó a 100 mg/ml con PBS conteniendo 0.01% de azida de sodio. Las muestras fecales fueron suspendidas por agitación en vórtex y limpiadas de desechos fecales por

centrifugación a 13,000 g por 5 minutos, los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a -70°C.

### **5.15. Análisis de la presencia de anticuerpos por el método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).**

La presencia de anticuerpos contra la proteína L1 del VPH16 se evaluó mediante un ensayo ELISA, usando como antígeno blanco VLP's (Virus Like Particles), constituidas por L1 y expresadas en el modelo de Baculovirus (Donadas generosamente por el Dr. John Schiller, National Institutes of Health, Bethesda MA, USA). Las placas para ELISA fueron cubiertas con 100 ng de VLP's por pozo, diluidas en 100  $\mu$ l de PBS. Las placas se incubaron a 4°C toda la noche. Las placas se lavaron 4 veces con TBS (Tris) 0.1% / Tween 20 (v/v). Para bloquear sitios de unión no específicos, se agregaron 200  $\mu$ l de solución TBS/ 0.1% (v/v) Tween 20 / 2% (p/v) BSA, por pozo y se incubó a 37°C por 2 horas. Transcurrido este tiempo, se volvieron a lavar las placas como se describió y se agregaron 100  $\mu$ l de suero (diluido 1:10 en solución de bloqueo TBS-T 2% BSA) y 100  $\mu$ l de secreciones cervicales y fecales (diluidas 1:2 en la misma solución de bloqueo anterior). Las placas se incubaron a 37°C por 2 horas y posteriormente se lavaron 6 veces con el mismo buffer; se adicionaron 100  $\mu$ l del anticuerpo secundario (Ab-Rabbit anti $\alpha$ IgG+A+M de ratón) acoplado a fosfatasa alcalina (AP, Dako Co. Carpinteria, CA ) por pozo, diluido 1:200 en solución bloqueadora y se incubó a 37°C por 2 horas; después de 6 lavados (Buffer TBS-T), se quitaron las burbujas y

se adicionó el sustrato de la AP, disolviendo una tableta de 5 mg de sustrato de fosfato Sigma 104 (Sigma Co. UK), en 5 ml de dietanolamina al 10 % (v/v) pH 9.8. A cada pozo se le adicionaron 100  $\mu$ l del sustrato y se incubaron por 2 horas, para poder revelar la presencia de anticuerpos mediante la reacción colorida entre la fosfatasa alcalina y su sustrato. La reacción fue determinada en un lector de ELISA a 405 nm.

## 6. RESULTADOS.

El genoma del Virus del Papiloma Humano tipo 16 (HPV 16) prototipo, de aproximadamente 8000 pares de bases se obtuvo a partir del plásmido puCHPV16, en donde se encontraba clonado como un fragmento *Bam HI – Bam HI*.

### 6.1. Obtención del gen L1.

El gen L1 se amplificó mediante PCR (sección 3.10) a partir del genoma completo de HPV 16 obtenido. El resultado de la amplificación se muestra en la Figura 5. Como control positivo se incluyó el plásmido pGFP16L1 que contiene la secuencia completa de L1 y como control negativo se usó agua en lugar de DNA. En el control positivo se pudo observar la amplificación de un producto de aproximadamente 1670 pb. La amplificación del genoma de HPV16 obtenido produjo una banda de un peso similar a la observada en el control positivo, y que corresponde con el peso esperado para el fragmento que contiene al gen L1. Por otra parte, en el control negativo no se observó amplificación de producto alguno. Estos resultados sugieren que el producto obtenido del PCR es el fragmento que contiene al gen L1.

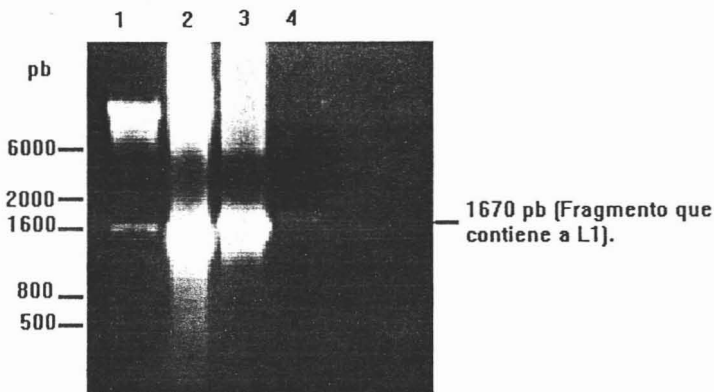


Figura 5. Amplificación del gen L1 a partir del genoma del HPV16. El gen L1 fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos EveL1F y 16L1Sal.

Carriles: 1.- Marcador de peso molecular; 2.- Control Positivo; 3.- Genoma de HPV16 obtenido de puCHPV16; 4.- Control negativo.

## 6.2. Clonación del gen L1 dentro del vector pcDNA3.

El gen L1 de HPV 16 se obtuvo por PCR como un fragmento *KpnI* – *XhoI* de 1670 pb y se ligó en el vector pcDNA3, para generar el plásmido pHPV16L1. El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias competentes. Posteriormente se seleccionaron 10 colonias bacterianas y su DNA se analizó para determinar la presencia del plásmido por restricción enzimática con *Hind* III. La enzima *Hind* III corta en un sitio único situado en la región de poli-clonación del vector pcDNA3 y no tiene sitio de corte en el inserto, por lo que se espera que linearice el plásmido, lo cual permitirá diferenciar las colonias recombinantes, que presentarían un fragmento único de 7Kb, de las no recombinantes, que

presentarían una banda de 5.4 Kb. En la Figura 6 se muestra el resultado del análisis de restricción para dos colonias. En ésta se observa que solamente la colonia número 2 presentaba una banda del tamaño esperado para el plásmido pHPV16L1 (Figura 6 carriles 2 y 3). Estas dos colonias fueron estudiadas posteriormente por restricción enzimática doble usando *Hind* III y *Xba* I. Al igual que *Hind* III, la enzima *Xba* I tiene un solo sitio de corte en la región de policonación del vector pcDNA3 y no corta al inserto, por lo que se espera que la doble digestión con estas enzimas libere un fragmento de 1670 pb conteniendo al inserto L1 y uno de 5.4 Kb que correspondería al vector. El resultado de esta doble digestión mostró que solamente la colonia 2 presentaba las 2 bandas esperadas, tanto de L1 como del vector (Figura 6 carriles 4 y 5). Dado que ésta es la misma colonia que presentó la banda de 7 Kb en la restricción enzimática anterior, los resultados sugieren que la colonia 2 es recombinante (Figura 6 carriles 3 y 5).

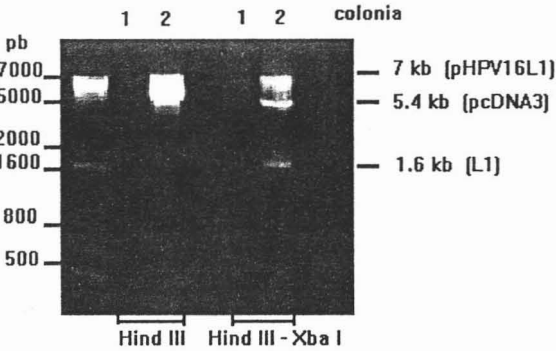




Figura 6. Análisis por restricción enzimática de las colonias bacterianas 1 y 2. Las colonias fueron analizadas con la enzima *Hind* III sola, o sometidas a una doble digestión con *Hind* III - *Xba* I como se indica.

El primer carril contiene el marcador de peso molecular.

Con el fin de corroborar que el fragmento clonado en el vector es el gen L1, se analizó el DNA de la colonia recombinante por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen L1 del HPV16. Como control positivo se usó el plásmido pGFP16L1, obtenido anteriormente en el laboratorio y como control negativo agua en lugar de DNA. La reacción produjo la amplificación de un fragmento de un peso similar al obtenido en el control positivo y que corresponde al esperado para el gen L1. Estos resultados muestran que el fragmento clonado es el gen L1 del HPV16 (Figura 7).

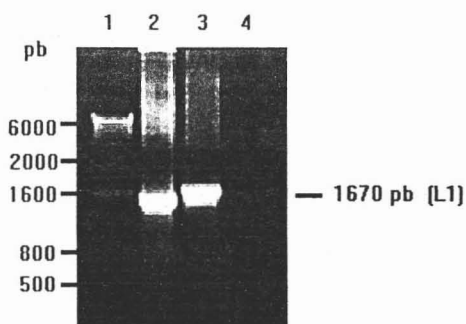


Figura 7. Amplificación del gen L1 a partir de la colonia recombinante (No. 2).

Carriles: 1.- Marcador de peso molecular; 2.- Control positivo (pGFP16L1); 3.- Producto de PCR de la colonia recombinante; 4.- Control negativo.

Juntos, estos resultados demuestran que la clonación del gen L1 dentro del vector de expresión pcDNA3 para formar el plásmido pHPV16L1 (Figura 8) fue exitosa.

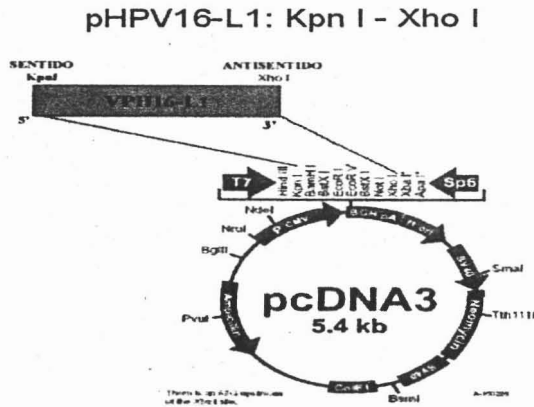


Figura 8. Representación esquemática de la clonación del gen L1 en el vector de expresión pcDNA3, en la región de policlonación, como un fragmento *Kpn I - Xho I*.

Como se indicó en la sección 3.10 el plásmido pctxB (Figura 9) fue construido previamente en el laboratorio, y contiene al gen que codifica para la subunidad B de la toxina colérica clonado como un fragmento *Not I - Xba I*, dentro del vector de expresión pcDNA3.

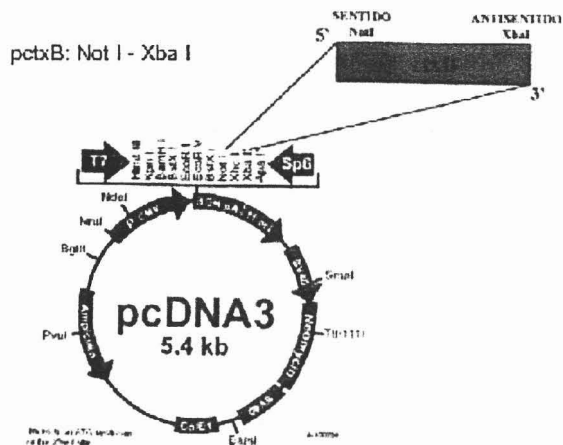


Figura 9. Representación esquemática de la clonación del gen de la toxina colérica como un fragmento *Not I* – *Xba I*, dentro del vector de expresión pcDNA3.

De igual forma, el plásmido quimérico pctxB/L1 (Figura 10) fue también construido previamente en el laboratorio, subclonando el gen L1 como un fragmento *Kpn I* – *EcoRV*, en el plásmido pctxB.

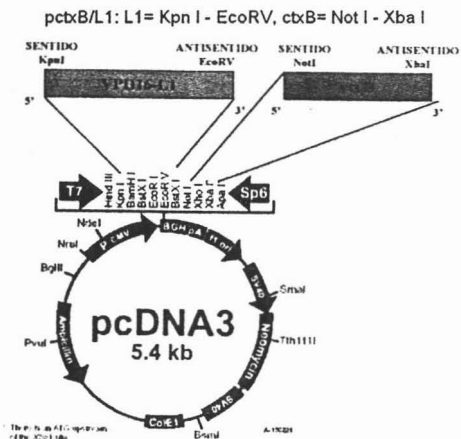


Figura 10. Representación esquemática de la subclonación del gen L1 como un fragmento *Kpn I* - *EcoRV*, en el plásmido pctxB.

Con la finalidad de determinar la integridad de las secuencias clonadas en los diversos plásmidos, los genes L1 y *ctxB* fueron analizados en este trabajo por secuenciación (sección 3.11). Al comparar las secuencias resultantes del análisis con las secuencias obtenidas del banco de datos (Gene-Bank), se pudo constatar que no hubo cambios en ellas.

### 6.3. Estudio de la expresión de L1 y *ctxB* a partir de los plásmidos.

Con la finalidad de determinar si los genes clonados son expresados a partir de los plásmidos en células vivas, se realizó un ensayo de expresión *in vivo* de los

plásmidos en células de mamífero, a través de la transfección de tumores de melanoma murino con los plásmidos pHPV16L1, pctxB y pctxB/L1. El RNA fue aislado, retrotranscrito a cDNA, y amplificado. Los resultados obtenidos muestran que se amplificó un fragmento de 325 pb correspondiente al tamaño esperado para la secuencia de ctxB, de las células transfectadas con el plásmido pctxB. (Figura 11 carril 2), por otro lado, se amplificó el fragmento completo del gen L1 de 1670 pb, de las células transfectadas con el plásmido pHPV16L1 (Figura 11 carril 3). Se amplificaron fragmentos del tamaño esperado tanto de ctxB, como de L1, de las células transfectadas con el plásmido quimérico pctxB/L1, utilizando oligonucleótidos específicos para ctxB (Figura 11 carril 4) o L1 (Figura 11 carril 5). Además se amplificó un fragmento de aproximadamente 2000 pb de las células transfectadas con el plásmido pctxB/L1 (Figura 11 carril 6), usando una combinación de los oligonucleótidos L1 forward y ctxB reverse, indicando que los genes de L1 y ctxB son transcritos como una sola secuencia.

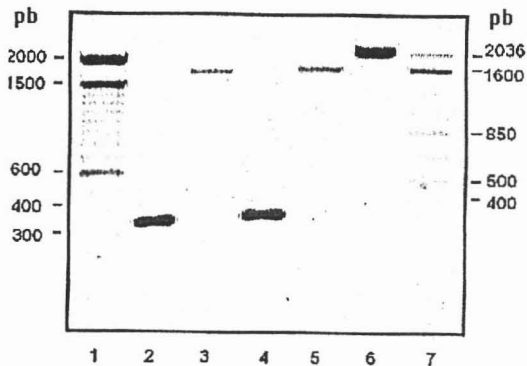


Figura 11. Análisis de la expresión de los genes L1 y ctxB en células de mamífero. Los plásmidos pctxB (carril 2), pHPV16L1 (carril 3), y pctxB/L1 (carriles 4, 5 y 6) fueron inyectados directamente

en tumores de melanoma creciendo en ratones. 48 hrs. después el RNA total de las células transfectadas fue extraído, retro-transcrito y amplificado utilizando oligonucleótidos específicos para el gen L1 (carriles 3 y 5), para la secuencia ctxB (carriles 2 y 4), o bien con una combinación de los oligonucleótidos L1-forward y ctxB-reverse (carril 6). Carriles 1 y 7.- marcadores de peso molecular.

Estos resultados sugieren que los genes clonados pueden ser expresados por células de mamífero, a partir de los plásmidos construidos. Por lo tanto se pueden utilizar para la inmunización de los ratones.

#### **6.4. Generación de anticuerpos en los ratones vacunados.**

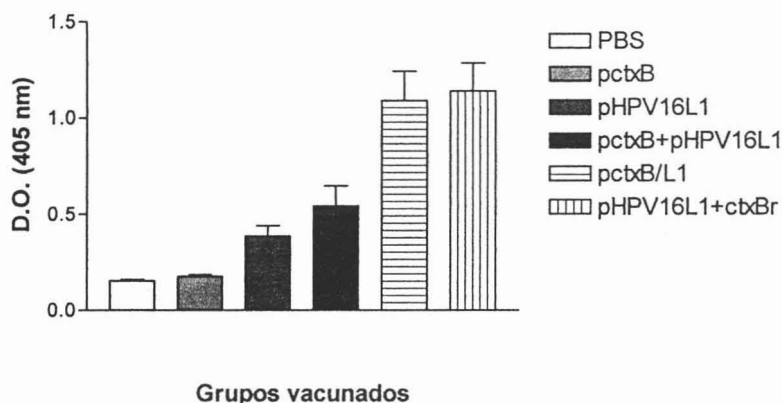
Se sabe que la subunidad B de la toxina del cólera es un fuerte adyuvante de la respuesta inmune de anticuerpos mediada por vacunas tradicionales. Sin embargo, se desconoce si el uso de la secuencia génica que codifica para dicha subunidad puede ser incorporada como un adyuvante en un modelo de vacuna génica. Para investigar acerca de este punto, en el presente trabajo se probó el efecto adyuvante de la inclusión de plásmidos que expresan ctxB para la generación de anticuerpos, tanto sistémicos (IgG) como secretorios (IgA cervicales y fecales), inducidos por una vacuna génica contra el HPV16. Para este fin se vacunaron grupos de ratones con el plásmido pHPV16L1 solo o en combinación con el plásmido pctxB. También se vacunaron ratones con el plásmido quimérico que expresa a L1 como una fusión con ctxB. Como controles negativos se utilizaron grupos de ratones vacunados con PBS o bien con el plásmido pctxB

solo. Finalmente, como un control positivo se incluyó un grupo de ratones vacunados con el plásmido pHPV16L1 en combinación con la subunidad B de la toxina colérica recombinante.

### **6.5. Efecto adyuvante de pctxB sobre la producción de anticuerpos del tipo IgA en secreciones cervicales.**

Las secreciones cervicales de los ratones vacunados fueron colectadas 28 días después de la vacunación. La presencia de anticuerpos fue analizada mediante ensayos de ELISA utilizando VLP's como antígeno blanco. Como se puede observar en la Gráfica 1, la vacunación con el plásmido pHPV16L1 indujo la generación de una respuesta de anticuerpos significativamente mayor a la observada en los controles negativos que recibieron solo PBS ( $p=0.002$ ), o fueron inmunizados con el plásmido pctxB ( $p=0.056$ ). De manera interesante, el promedio de la respuesta de anticuerpos incrementó cuando se utilizó el plásmido pctxB como adyuvante, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.161$ ). Por otro lado, es notable observar que la vacunación con el plásmido que expresa a L1 como una fusión con ctxB indujo un incremento en la respuesta promedio de anticuerpos que resultó altamente significativa ( $p=0.0002$ ), sugiriendo que la expresión conjunta de las proteínas tiene un efecto adyuvante sobre la producción de anticuerpos cervicales. Como se esperaba, la co-administración de la subunidad B recombinante produjo un efecto adyuvante significativo ( $p<0.0001$ ). Es interesante hacer notar que cuando se comparó el efecto adyuvante producido

por la proteína de fusión y la subunidad recombinante no se observó una diferencia significativa ( $p=0.7413$ ), lo que sugiere que poseen un efecto similar.



Gráfica 1. Detección de anticuerpos IgA en Secreciones Cervicales. Grupos de 10 ratones fueron vacunados por la vía oral con el plásmido pHPV16L1 solo, en combinación con pctxB, y con el plásmido de fusión pctxB/L1. Como controles negativos se utilizaron grupos de ratones inmunizados con PBS o con pctxB solo. Como control positivo se incluyó un grupo que recibió pHPV16L1 co-administrado con la subunidad B de la toxina colérica recombinante (ctxB). Las barras representan el valor promedio de absorbancia de los 10 ratones de cada grupo por duplicado. La Desviación Estándar de cada grupo de datos se presenta en cada barra.

Adicionalmente se realizó el análisis cuantitativo de la proporción de individuos que respondieron a la vacunación en los diferentes grupos experimentales. Los resultados se pueden observar en la Tabla 1. El valor de corte de positividad a la presencia de anticuerpos se calculó como el promedio de los valores de absorbancia obtenidos en los grupos de ratones inmunizados con PBS y con el plásmido pctxB. En el grupo de ratones que recibieron el plásmido pHPV16L1 se



observó que 7 de 10 presentaron anticuerpos contra L1, mientras que solo 6 de 10 del grupo que recibió el plásmido pHPV16L1 en combinación con pctxB respondieron generando anticuerpos. En el caso del grupo que recibió el plásmido quimérico el número de animales que generaron una respuesta de anticuerpos se incrementó a 8 de 10. Finalmente en el grupo que recibió el plásmido pHPV16L1 en combinación con la subunidad B recombinante se observó que 9 de 10 animales generaron una respuesta positiva de anticuerpos.

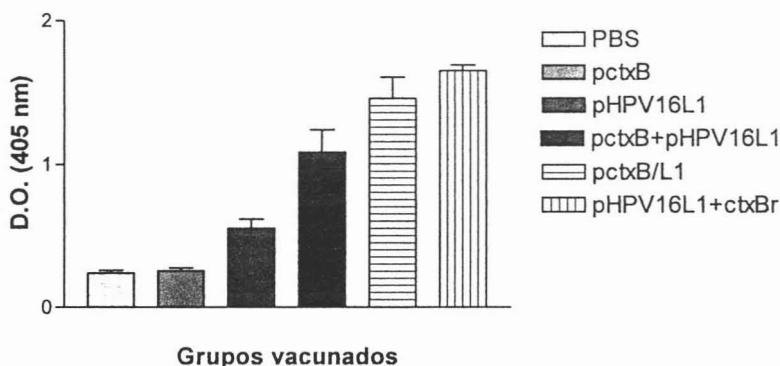
Tabla 1. Estudio cuantitativo de los individuos que desarrollaron una respuesta de anticuerpos de tipo IgA en Secreciones Cervicales después de la vacunación.

VACUNACIÓN	No. DE ANIMALES VACUNADOS	No. DE ANIMALES CON ANTICUERPOS
PBS	10	0
pctxB	10	0
pHPV16L1	10	7
pctxB + pHPV16L1	10	6
pctxB/L1	10	8
pHPV16L1 + ctxB	10	9

### 6.6. Efecto adyuvante de pctxB sobre la producción de anticuerpos del tipo IgA en extractos fecales.

Los extractos fecales de los ratones vacunados fueron colectados 28 días después de la vacunación. La presencia de anticuerpos fue analizada mediante ensayos ELISA como se mencionó en la sección 6.5. Como se puede observar en la Gráfica 2, la vacunación con el plásmido pHPV16L1 indujo la generación de una respuesta de anticuerpos significativamente mayor a la observada en los controles

negativos que recibieron PBS ( $p=0.0008$ ), o fueron inmunizados con el plásmido pctxB ( $p=0.433$ ). De suma importancia fue el hecho de que el promedio de la respuesta de anticuerpos incrementó cuando se utilizó el plásmido pctxB como adyuvante, siendo estadísticamente significativo ( $p=0.0068$ ). Por otro lado se observó que la vacunación con el plásmido que expresa a L1 como una fusión con ctxB indujo un incremento en la respuesta promedio de anticuerpos que fue altamente significativa ( $p<0.0001$ ), lo cual sugiere que la expresión conjunta de las proteínas tiene un efecto adyuvante sobre la producción de anticuerpos anales, y mayor que la respuesta obtenida en secreciones cervicales. Como se esperaba, la co-administración de la subunidad B recombinante produjo un efecto adyuvante significativo ( $p<0.0001$ ). Es necesario decir que cuando se comparó el efecto adyuvante producido por la proteína de fusión y la subunidad recombinante se observó una diferencia significativa ( $p=0.0008$ ), lo cual sugiere que la subunidad recombinante posee un efecto mayor de capacidad adyuvante.



Gráfica 2. Detección de anticuerpos IgA en extractos fecales. Grupos de 10 ratones fueron vacunados por la vía oral con el plásmido pHPV16L1 solo, en combinación con pctxB, y con el plásmido de fusión pctxB/L1. Como controles negativos se utilizaron grupos de ratones inmunizados con PBS o con pctxB solo. Como control positivo se incluyó un grupo que recibió pHPV16L1 co-administrado con la subunidad B de la toxina colérica recombinante (ctxBr). Las barras representan el valor promedio de absorbancia de los 10 ratones de cada grupo por duplicado. La Desviación Estándar de cada grupo de datos se presenta en cada barra.

Se realizó también el análisis cuantitativo de la proporción de individuos que respondieron a la vacunación en los diferentes grupos experimentales. Los resultados se pueden observar en la Tabla 2. El valor de corte de positividad a la presencia de anticuerpos se calculó como el promedio de los valores de absorbancia obtenidos en los grupos de ratones inmunizados con PBS y con el plásmido pctxB. En el grupo de ratones que recibieron el plásmido pHPV16L1 se observó que 7 de 10 presentaron anticuerpos contra L1, mientras que 8 de 10 del grupo que recibió el plásmido pHPV16L1 en combinación con pctxB respondieron generando anticuerpos. En el caso del grupo que recibió el plásmido quimérico el

número de animales que generaron una respuesta de anticuerpos se incrementó a 9 de 10. Finalmente en el grupo que recibió el plásmido pHPV16L1 en combinación con la subunidad B recombinante se observó que los 10 animales generaron una respuesta positiva de anticuerpos.

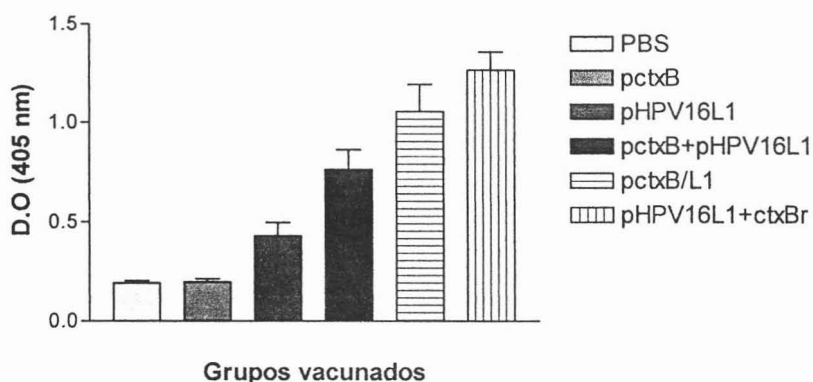
Tabla 2. Estudio cuantitativo de los individuos que desarrollaron una respuesta de anticuerpos de tipo IgA en extractos fecales después de la vacunación.

VACUNACIÓN	No. DE ANIMALES VACUNADOS	No. DE ANIMALES CON ANTICUERPOS
PBS	10	0
pctxB	10	0
pHPV16L1	10	7
pctxB + pHPV16L1	10	8
pctxB/L1	10	9
pHPV16L1 + ctxBr	10	10

### 6.7. Efecto adyuvante de pctxB sobre la producción de anticuerpos del tipo IgG en suero.

La sangre de los ratones vacunados fue colectada 28 días después de la vacunación. La presencia de anticuerpos fue analizada mediante ensayos ELISA como se describió en la sección 4.5. Como se puede observar en la Gráfica 3, la vacunación con el plásmido pHPV16L1 indujo una generación de anticuerpos significativamente mayor a la observada en los controles negativos que recibieron solo PBS ( $p=0.0058$ ), o fueron inmunizados con el plásmido pctxB ( $p=0.764$ ). Interesantemente, el promedio de la respuesta de anticuerpos incrementó cuando se utilizó el plásmido pctxB como adyuvante, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0073$ ). Por otro lado, es interesante observar

que la vacunación con el plásmido que expresa a L1 como una fusión con ctxB indujo un incremento en la respuesta promedio de anticuerpos que resultó altamente significativa ( $p=0.0001$ ), sugiriendo que la expresión conjunta de las proteínas también tiene un efecto adyuvante sobre la producción de anticuerpos sistémicos. Por otro lado, la co-administración de la subunidad B recombinante produjo un efecto adyuvante significativo ( $p<0.0001$ ). Es interesante hacer notar que cuando se comparó el efecto adyuvante producido por la proteína de fusión y la subunidad recombinante sí se observó una diferencia significativa ( $p=0.0438$ ), lo que sugiere que la toxina recombinante tiene un efecto adyuvante mayor en la generación de anticuerpos IgG circulantes.



Gráfica 3. Detección de anticuerpos IgG en suero. Grupos de 10 ratones fueron vacunados por la vía oral con el plásmido pHPV16L1 solo, en combinación con pctxB, y con el plásmido de fusión pctxB/L1. Como controles negativos se utilizaron grupos de ratones inmunizados con PBS o con pctxB solo. Como control positivo se incluyó un grupo que recibió pHPV16L1 co-administrado con la subunidad B de la toxina colérica recombinante (ctxBr). Las barras representan el valor promedio

de absorbancia de los 10 ratones de cada grupo por duplicado. La Desviación Estándar de cada grupo de datos se presenta en cada barra.

Como en el caso de las secreciones cervicales y los extractos fecales, se realizó el análisis cuantitativo de la proporción de individuos que respondieron a la vacunación en los diferentes grupos experimentales. Los resultados se pueden observar en la Tabla 3. El valor de corte de positividad a la presencia de anticuerpos se calculó como el promedio de valores de absorbancia obtenidos en los grupos de ratones inmunizados con PBS y con el plásmido pctxB. En el grupo de ratones que recibieron el plásmido pHPV16L1 se observó que 7 de 10 presentaron anticuerpos contra L1, mientras que 8 de 10 del grupo que recibió el plásmido pHPV16L1 en combinación con pctxB respondieron generando anticuerpos. En el caso del grupo que recibió el plásmido quimérico el número de animales que generaron una respuesta de anticuerpos se incrementó a 9 de 10. Finalmente en el grupo que recibió el plásmido pHPV16L1 en combinación con la subunidad B recombinante se observó que los 10 animales generaron una respuesta positiva de anticuerpos.

Tabla 3. Estudio cuantitativo de los individuos que desarrollaron una respuesta de anticuerpos de tipo IgG en suero después de la vacunación.

VACUNACIÓN	No. DE ANIMALES VACUNADOS	No. DE ANIMALES CON ANTICUERPOS
PBS	10	0
pctxB	10	0
pHPV16L1	10	7
pctxB + pHPV16L1	10	8
pctxB/L1	10	9
pHPV16L1 + ctxB	10	10

## 7. DISCUSIÓN.

En este proyecto se estudió el efecto adyuvante de la subunidad B de la toxina del cólera como potenciador de la respuesta inmune mediada por anticuerpos tipo IgA secretorios e IgG séricos, después de inmunizar por vía oral con una vacuna génica conteniendo la secuencia del gen L1 del Virus de Papiloma Humano tipo 16. Los resultados indican que la inclusión de ctxB aumenta la producción de anticuerpos específicos, dando lugar a una mayor respuesta humoral en mucosas y suero.

En el estudio de la expresión de los genes L1 y ctxB *in vivo*, a partir de los plásmidos pHPV16L1, pctxB y pctxB/L1, se observó que los genes L1 y ctxB pudieron ser expresados en células de mamífero a partir de los plásmidos pHPV16L1 y pctxB respectivamente, como lo indica la presencia del RNA mensajero para cada uno. Estos resultados sugieren que los genes clonados en estos vectores se transcriben eficientemente en células de mamífero. Además, de la misma manera se pudo observar que en las células transfectadas con el plásmido quimérico pctxB/L1, los genes de L1 y ctxB son transcritos como una sola secuencia, por lo que se espera la producción de una proteína de fusión. El análisis de RNA mensajero muestra que los genes están siendo transcritos, sin embargo no demuestra que las proteínas se producen. Para demostrar lo anterior sería necesario extraer las proteínas de las células transfectadas, separarlas por electroforesis, y detectar las proteínas de interés mediante un Western Blot con



anticuerpos específicos contra L1 ó ctxB.

Los anticuerpos IgAs producidos en superficies mucosas son la primera línea de defensa en contra de patógenos que infectan las membranas mucosas (Goodman, 1991). Se sabe que la mucosa genital es la vía de entrada del HPV16 al organismo, por lo que es importante que una vacuna sea capaz de inducir la producción de este tipo de anticuerpos.

La producción de anticuerpos del tipo IgA fue evaluada en secreciones cervicales. Como se esperaba, la vacunación con el plásmido que expresa L1 indujo la síntesis de anticuerpos específicos. El nivel de producción de este tipo de anticuerpos aumentó con la co-administración de ctxB recombinante. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Chen [1990] y Hirabayashi [1991], quienes observaron el incremento en el nivel de anticuerpos IgA, utilizando a ctxB como adyuvante después de una vacunación contra la influenza, por vía oral e intranasal, respectivamente, y sugieren que la ctxB puede ser utilizada como un adyuvante de la generación de anticuerpos cervicales mediados por vacunas génicas. Es interesante observar que la co-administración del plásmido que codifica la ctxB indujo un aumento en la producción de anticuerpos cervicales, pero este incremento no fue significativo. Esta observación contrasta con el hecho de que la vacunación con el plásmido que expresa la proteína quimérica L1-ctxB produjo un aumento significativo de la respuesta de anticuerpos, mismo que fue similar al producido por la toxina recombinante. Es probable que esta diferencia se deba a que durante la co-administración de 2 plásmidos diferentes, las células no

estén internalizando la misma cantidad de un plásmido que del otro, y por lo tanto no se produzca una cantidad adecuada de adyuvante, mientras que cuando se administra la toxina recombinante junto con el plásmido que codifica para L1, la toxina va purificada y es más fácil que sea reconocida por las células del sistema inmunológico, obteniéndose una respuesta más rápida y efectiva, que cuando se administra el plásmido. Esta observación coincide con lo encontrado por Hörnquist y sus colaboradores, de que la subunidad B de la toxina colérica es el adyuvante más potente en mucosas (Hörnquist et al, 1994), aún cuando es administrada por vía oral (Rask et al, 2000), aumentando la respuesta de anticuerpos locales (Spangler, 1992).

Por otro lado, el estudio cuantitativo de los individuos que desarrollaron una respuesta de anticuerpos IgA en secreciones cervicales, corrobora lo anterior, ya que se pudo observar que fue mayor el número de individuos que respondió cuando se vacunó con el plásmido que expresa L1, que cuando se vacunó co-administrando pctxB, apoyando la teoría de que quizás la respuesta pudo haber sido menor en la co-administración ya que eran 2 plásmidos diferentes y la captación de estos por las células no fue igual que si se administrara uno solo. De igual manera se observó que el número de individuos que respondió fue mayor que los anteriores cuando se administró el plásmido quimérico, pero fue uno más el que respondió cuando se administró la toxina recombinante, apoyando nuevamente la capacidad adyuvante de ctxB y demostrando que la toxina recombinante purificada produce mayor respuesta, medida en este caso por un individuo más que responde.

La producción de anticuerpos del tipo IgA fue también analizada en extractos

fecales. La vacunación con el plásmido que expresa L1 indujo la producción de esta clase de anticuerpos. Esta observación resulta interesante porque anteriormente no se había probado la capacidad de la vacuna génica para producir anticuerpos de la mucosa que recubre el tracto digestivo, y se pudo observar que al utilizar la secuencia génica que expresa ctxB, el nivel de anticuerpos aumentó de manera significativa. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Czerkinsky y colaboradores [1989], en cuanto a que ctxB provoca un incremento en la inmunidad de mucosas contra un antígeno foráneo, incluyendo la formación de anticuerpos IgA en el intestino después de una inmunización oral, e implican que ctxB puede ser utilizado como un adyuvante muy eficiente para producir una respuesta de anticuerpos IgA en la mucosa gastro-intestinal.

Según lo encontrado en un estudio, la producción de anticuerpos IgA generada por ctxB es mediada por la interleucina TGF- $\beta$ 1 y es dependiente de IL-2 como cofactor (Pyeong-Hyeun et al, 1998). Se sabe que TGF- $\beta$ 1 promueve la recombinación de las cadenas pesadas para IgA en células murinas y humanas, y la IL-2 puede promover la secreción de IgA por células B del bazo (Kim y Kagnoff, 1990), ya que permite la activación de células B que a su vez encienden a las IgA, promoviendo así su secreción (Pyeong-Hyeun et al, 1998).

Por otro lado, la co-administración del plásmido pctxB, indujo un incremento en los anticuerpos presentes en los extractos fecales, que a diferencia de lo observado en secreciones cervicales, fue estadísticamente significativo. Es posible que esta

diferencia se deba a la presentación al sistema inmune en la superficie mucosa gastro-intestinal a través de la capacidad de ctxB de unirse a los receptores GM1 de las células epiteliales y así potenciar el transporte del antígeno a través del epitelio (Neutra et al, 1987). Esto podría ser más rápido y efectivo ya que esta zona se encuentra más cerca de la cavidad oral por donde fue administrado el plásmido, a diferencia del epitelio cervical en donde quizás la captura de los genes sea un poco más compleja por todo el recorrido que tiene que hacer el plásmido que los contiene para poder ser captados por las células del epitelio cervical. Para demostrar lo anterior sería necesario realizar un ensayo de unión al gangliósido GM1, utilizando células del epitelio gástrico y compararlo con epitelio cervical, para poder observar las diferencias en los niveles de unión de ctxB a los 2 epitelios. Coincidentemente con lo observado en los anticuerpos cervicales, la respuesta de IgA en extractos fecales fue de manera importante potenciada por el plásmido que expresa la proteína de fusión L1-ctxB. El efecto adyuvante de esta fusión fue similar al registrado para la subunidad B recombinante.

Es importante mencionar que los niveles de anticuerpos encontrados fueron más altos en los extractos fecales que en las secreciones cervicales, en todos los grupos experimentales. Quizá el efecto es menor en el epitelio cervical debido a que inicialmente ctxB que es el adyuvante que utilizamos en este experimento, tiene predilección para unirse a las células del epitelio mucoso que se encuentra en el intestino, y tal vez en el paso a la mucosa urogenital, el efecto adyuvante puede ir diluido y verse disminuida su capacidad para producir anticuerpos. Por otro lado, las células del epitelio cervical (endometrio) se desprenden en la última

parte de la fase lútea llamada fase secretoria en el ciclo estral de las ratonas, debido a que el óvulo liberado no fue fertilizado (Animal Physiology, 1997), y ya que estas son poliéstricas continuas y su ciclo estral tiene una duración de 4 a 5 días (Ganong, 1991), esto pudo haber influido en que hubiera una menor captación de los plásmidos por las células del epitelio cervical, y por consiguiente la respuesta inmunológica humoral fue un poco más baja que la observada en la mucosa intestinal.

Se observó también la respuesta de los individuos de cada grupo experimental, y al igual que lo encontrado en secreciones cervicales, la co-administración de pctxB produjo una respuesta en un mayor número de individuos que cuando se administró el plásmido que codifica para L1 solo, sin embargo, el número de animales que respondieron en estos 2 casos, fue mayor al que se observó en secreciones cervicales. El plásmido quimérico produjo una respuesta en un número mayor de individuos que la co-administración de los plásmidos, e interesantemente la toxina recombinante produjo una respuesta de anticuerpos en el 100% de los individuos, apoyando lo discutido en cuanto a que el nivel de anticuerpos IgA es mayor en extractos fecales que en secreciones cervicales.

La producción de anticuerpos IgG en suero fue evaluada y se observó una respuesta significativa en la producción de estos anticuerpos cuando se administró el plásmido que codifica para L1, de la misma manera que la respuesta de anticuerpos observada en secreciones cervicales y extractos fecales. La co-administración de pctxB tuvo un efecto adyuvante en la producción de los anticuerpos circulantes, que al igual a lo que se observó en extractos fecales, tuvo

un valor significativo, lo cual nos indica que no solo se está obteniendo una respuesta local, sino que también se obtiene una respuesta de anticuerpos de tipo IgG sistémica.

De la misma manera a lo observado en secreciones cervicales y extractos fecales, se observó una potenciación significativa de la respuesta de IgG mediada por el plásmido quimérico. Finalmente, cuando se comparó la respuesta inducida por el plásmido quimérico con la respuesta obtenida de la toxina recombinante, se vió que sí hubo una respuesta significativa de la toxina recombinante, al igual que lo observado en los IgA's de los extractos fecales, corroborando una vez más que existe una mayor adyuvancia producida por la toxina recombinante tanto en IgAs como IgG circulantes. Esta observación coincide con lo encontrado por Shen [2000], Czerkinsky [1989] y Arrington [2002], de la capacidad de la subunidad B de la toxina del cólera para potenciar una respuesta inmune, aumentando la producción de anticuerpos séricos (IgG), en otros modelos de vacunas génicas, por el uso de vectores plasmídicos que codifican la secuencia de esta subunidad. Al realizar el estudio cuantitativo de los individuos que desarrollaron una respuesta de anticuerpos IgG en suero, se pudo observar exactamente el mismo comportamiento presente en los resultados obtenidos cuando se evaluó el número de individuos que respondieron al tratamiento en secreciones fecales, aunque el promedio del nivel de anticuerpos es menor al observado en extractos fecales, lo cual nos indica que responde el mismo número de animales a cada tratamiento, pero produciendo una cantidad menor de estos.

Al evaluar la capacidad inmunoestimulante de los plásmidos utilizados como vacuna en este estudio, se pudo observar que el plásmido quimérico fue el que demostró una mayor capacidad adyuvante, sin embargo no se sabe aún si la localización extracelular y el tamaño de la proteína de fusión afecta las propiedades físicas y biológicas de ctxB, lo cual podría ser importante para la inmunogenicidad producida por la proteína quimérica, ya que se sabe que su capacidad inmunológica está relacionada al menos en parte, a su afinidad por el gangliósido GM1, (receptor de membrana) (Dertzbaugh y Elson, 1993). Para poder demostrarlo, sería necesario realizar un análisis de expresión del plásmido quimérico in vitro y un Western Blot con el fin de conocer la correcta expresión y el tamaño de la proteína de fusión, así como también un ELISA para corroborar la unión a los anticuerpos específicos anti-L1 y anti-ctxB.

Los resultados sugieren que ctxB posee una propiedad esencial para incrementar la respuesta de anticuerpos en el tracto intestinal y que esta es mayor a la producida en el tracto genital y sistémica, respectivamente, esto podría deberse a la correcta expresión de la proteína ctxB en el epitelio que recubre al tracto intestinal (Dertzbaugh y Elson, 1993), y como se mencionó anteriormente, a que pasa primero por este epitelio que al torrente sanguíneo y finalmente al epitelio cervical, los cuales presentan características químicas ligeramente diferentes.

Se sabe que ctxB debe estar ensamblada en forma de pentámero para poder expresar su capacidad adyuvante (Hörnquist et al, 1994). Es muy probable que la toxina recombinante mantenga dicha conformación, y produzca por tanto un efecto

adyuvante potente. En nuestro trabajo observamos que la potenciación inmune mediada por el plásmido quimérico fue menor a la producida por la toxina recombinante. Esto podría deberse a la concentración en que se encuentra la toxina, es decir, cuando se administra la subunidad recombinante la concentración es conocida, sin embargo, cuando se administra el plásmido que codifica para dicha subunidad, la concentración que se conoce es la del plásmido y no la de la subunidad B de la toxina.

La decisión de utilizar solo la subunidad B y no la toxina colérica completa, se basó en estudios anteriores que han demostrado que ésta es segura para su administración en humanos a diferencia de la subunidad A que es tóxica (Spangler, 1992; Arrington et al, 2002), ya que es translocada a la célula después de unirse la subunidad B al receptor celular, una vez dentro de la célula hospedera, es desdoblada en el retículo endoplásmico para poder llegar al citosol en donde la subunidad A se repliega nuevamente, evadiendo al proteosoma y generando toxicidad dentro de la célula (Lencer y Tsai, 2003).

Existen estudios que confirman la seguridad del uso de ctxB como adyuvante en vacunas humanas, como el realizado por Lucas y colaboradores [2005], en donde utilizaron la subunidad B recombinante en una vacuna oral contra el cólera en una población urbana del Sahara africano, que resultó altamente efectiva en esta población con una alta prevalencia de infección por HIV. En un estudio realizado por Taylor y colaboradores [2000], demostraron la efectividad de la subunidad B recombinante en una vacuna oral contra el cólera, en un grupo de personas de 2 a



65 años en Perú, en un lapso de 2 años. Existe también un estudio realizado por Petersen y colaboradores [2003], en donde se acopló la subunidad B a insulina humana y porcina para reducir la respuesta auto-agresiva que se obtiene al utilizar la insulina humana sola, y se encontró que este acoplamiento puede ser utilizado para producir una respuesta de las células reguladoras de la insulina utilizando una menor cantidad de insulina humana, así mismo abre las posibilidades de utilizar este adyuvante oralmente para la prevención de la diabetes tipo I.

Según algunos reportes, la duración de la respuesta inmune generada por una vacuna génica tiene una permanencia a largo término, esta afirmación se basa en estudios en donde se ha dado seguimiento a inmunizaciones en las cuales se han detectado anticuerpos en contra del antígeno hasta 2 años después de la primera inmunización (Fazio et al, 2004). Otro estudio soporta la hipótesis de que las vacunas génicas pueden desencadenar una respuesta humoral, seguida de una respuesta de células B y T de memoria que es mantenida en una parte significativa de la vida del animal (Hassett et al, 2000), aún cuando son administradas en los primeros días de vida.

Algunos reportes sugieren que la vacunación génica puede promover una respuesta inmune de larga duración (Minor, 1995). Sin embargo, se sabe que la inmunización génica por la vía oral requiere ser administrada en dosis repetidas, ya que es indispensable la expresión prolongada de la proteína antigénica para desarrollar una adecuada respuesta inmune en las mucosas (Ramachandran, 1998).

La respuesta inmune sistémica y en la mucosa que recubre el tracto ano-genital que se obtuvo en este trabajo podría permanecer por un largo periodo de tiempo, ya que existen reportes de que la respuesta inmunológica humoral en mucosas y sistémica producida por una vacuna de DNA, puede producir células de memoria, esto aunado a que la respuesta producida por *Vibrio cholerae* puede durar años, sin embargo se requiere de un estudio de seguimiento a través del tiempo de vida de las ratonas vacunadas, que podría ser un periodo de aproximadamente 2 años, midiendo el título de anticuerpos, así como también la respuesta inmune mediada por células, incluyendo como grupos de estudio a las ratonas inmunizadas con el plásmido quimérico y utilizando como control positivo al plásmido pHPV16L1 más la subunidad B recombinante.

Las vacunas de DNA ofrecen una serie de ventajas sobre las vacunas tradicionales, incluyendo una gran estabilidad además de iguales ventajas cuando son administradas con un adyuvante. El uso de plásmidos que codifican moléculas con capacidades adyuvantes demostradas, podría ser una alternativa conveniente para mejorar la eficacia de vacunas de DNA, sin disminuir sus ventajas para un desarrollo comercial. Se ha podido demostrar que este tipo de vacunas presentan muy pocos efectos colaterales que no son peligrosas para los individuos inmunizados, además de que los genes que controlan la replicación del plásmido de origen bacteriano no tienen homología o similitud con las secuencias génicas en un hospedero eucariótico, esto reduce considerablemente la probabilidad de recombinación e integración con el DNA hospedero. Otra gran ventaja de las vacunas génicas desde el punto de vista de los países en vías de desarrollo, es

que pueden ser manufacturadas sin una sofisticada tecnología de producción y purificación de proteínas.

Con base en lo anterior y a los resultados obtenidos en este proyecto, podemos ver la necesidad de realizar estudios posteriores para poder igualar la potenciación de las respuestas obtenidas con la subunidad B y con el plásmido quimérico en el modelo de vacuna génica contra HPV16, para que esta fusión de la proteína antigénica L1 a la subunidad B de la toxina del cólera, produzca una respuesta inmune de tipo celular que perdure en el tiempo de vida del organismo vacunado.

## **8. CONCLUSIONES.**

El uso de la secuencia codificadora para la subunidad B de la toxina del cólera, incrementa significativamente la producción de anticuerpos específicos mediados por una vacuna génica contra L1, en suero y en las mucosas gástrica y cervical.

El nivel de potenciación de la respuesta de anticuerpos inducido por un plásmido quimérico que contiene a los genes L1 y ctxB, es mayor que el inducido por la co-administración de plásmidos individuales.

El efecto potenciador del plásmido quimérico fue semejante al inducido por la toxina recombinante en la mucosa cervical, marginalmente superior en el suero y significativamente más alto en la mucosa gástrica.

La secuencia codificadora de la subunidad B de la toxina colérica puede ser usada como un adyuvante en vacunas génicas de administración oral, para potenciar una respuesta inmune sistémica y en el tracto ano-genital.

## **APÉNDICE A:**

### **Buffer de carga**

**Azul de bromofenol 0.25%**  
**Xilencianol FF 0.25%**  
**Glicerol puro 45.0%**

Los colorantes se disuelven en 20 ml de agua destilada estéril con un agitador magnético hasta asegurarse de que se disuelvan por completo (si es necesario, agregar otros 20 ml de agua). Se agrega poco a poco el glicerol manteniendo la agitación y se afora a 100 ml, se almacena a temperatura ambiente.

### **Buffer de Elusión TAE 1x (Tris-Acetato)**

**Tris-acetato 0.04 M**  
**EDTA 0.001 M**

Para preparar este buffer, se disuelven los reactivos anteriores en agua desionizada y se afora al volumen deseado. Se esteriliza en autoclave (15 lb/sq en ciclo líquido). Se almacena a temperatura ambiente.

### **Buffer TBE 1x (Tris-Borato-EDTA)**

**Tris-base 0.45 M**  
**Ácido Bórico 0.45 M**  
**EDTA 0.001 M**

Para preparar 1 litro de este buffer, se disuelven 5.45 g de Tris-base más 2.78 g de ácido bórico, en 800 ml de agua desionizada, posteriormente se agregan 0.37g de EDTA y se ajusta el pH a 8.0, se afora a 1000 ml y se esteriliza en autoclave (15 lb/sq en ciclo líquido). Se almacena a temperatura ambiente.

### **Buffer TE (Tris-HCl EDTA, pH 8.0) 1X**

**Tris-HCl 10 mM**  
**EDTA 1 mM**

Para preparar 1 litro de este buffer, se disuelven 1.21 g de Tris-HCl más 0.37 g de EDTA, en 800 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 8.0, se afora a 1000 ml y se esteriliza en autoclave (15 lb/sq en ciclo líquido). Se almacena a temperatura ambiente.

### **Gel de Agarosa al 1%**

**1 g de agarosa**  
**100 ml de Buffer TBE 1x**

Se disuelve en calor, ya bien disuelta la agarosa se deja enfriar y se le agregan 100 µl de Bromuro de Etidio (0.5 mg/ml).

### **Medio LB**

**10 g de Bactotriptona**  
**5 g de Extracto de levadura**  
**10 g de NaCl**  
**400 µl de NaOH 10 M**

Se disuelven en agua destilada y se afora a 1 L, ajustando el pH a 7.5, se esteriliza en autoclave y se conserva en refrigeración en condición estéril.

### **PBS 1X (1L)**

<b>KCl</b>	<b>0.2 g</b>
<b>NaCl</b>	<b>8.0 g</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>0.24 g</b>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>1.44 g</b>

Se disuelven todos los reactivos en 800 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 8.0. Se afora a 1L y se esteriliza en autoclave (15 lb/sq en ciclo líquido). Se almacena a temperatura ambiente.

---

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J, Leong JA. 1996. **Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus.** *Mol Mar Biol Biotechnol.* 2:114-122.

Anjuère F, George-Chandy A, Audant F, Rosseau D, Holmgren J, Czerkinsky C. 2003. **Transcutaneous immunization with cholera toxin B subunit adjuvant suppresses IgE antibody responses via selective induction of Th1 immune responses.** *J Immunol.* 170:1586-1592.

Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. 1994. **HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity.** *Nat Genet.* 2: 157-162.

Armstrong SJ, Dimmock NJ. 1992. **Neutralization of influenza virus by low concentrations of hemagglutinin-specific polymeric immunoglobulin A inhibits viral fusion activity, but activation of the ribonucleoprotein is also inhibited.** *J Virol.* 66:3823-3832.

Arrington J, Braun RP, Dong L, Fuller DH, Macklin MD, Umlauf SW, Wagner SJ, Wu MS, Payne LG, Haynes JR. 2002. **Plasmid vectors encoding cholera toxin or the heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* are strong adjuvants for DNA vaccines.** *J Virol.* 9: 4536-4546.



Audibert FM and Lise LD. 1993. **Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects.** Immunol Today. 6:281-284.

Bailey I, Jenner E. 1995. Benefactor to mankind. In: Plotkin SA and Fantini B, eds. **Vaccinia, Vaccination, Vaccinology. Jenner, Pasteur and their successors.** New York: Elsevier.

Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. 1987. **Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines.** J Virol. 4: 962-971.

Bardiya N, Bae JH. 2005. **Influenza vaccines: recent advances in production technologies.** Appl Microbiol Biotechnol. 3:299-305.

Bona CA. 2002. **Principles of Vaccine Development.** In: Immunotherapy for infectious diseases. Edited by JM Jacobson. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 129-147.

Bosch, FX, Muñoz N. 2002. **The viral etiology of cervical cancer.** Virus Res. 89: 183-190.

Breirburd F, Croissant O, Orth G. 1987. **Expression of human papillomavirus type E4 gene products in warts.** Cancer Cells. 5:115-122.

Bright R, Sheares M, Kennedy R. 1995. **Nucleic acid vaccination against virally induced tumors.** Ann N Y Acad Sci. 772: 241-254.

Broker TR, Botchan M. 1986. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. *Cancer Cells*. 4:17-36.

Brown DR, Fife KH, Wheeler CM, Koutsky LA, Lupinacci LM, Railkar R, Suhr G, Barr E, Dicello A, Li W, Smith JF, Tadesse A, Jansen KU. 2004. Early assessment of the efficacy of a human papillomavirus type 16 L1 virus-like particle vaccine. *Vaccine*. 21-22:2936-2942.

Chaicumpa W, Chongsa-nguan M, Kalambaheti T, Wilairatana P, Srimanote P, Makakunkijcharoen Y, Looareesuwan S, Sakolvaree Y. 1998. Immunogenicity of liposome-associated and refined antigen oral cholera vaccines in Thai volunteers. *Vaccine*. 7:678-684.

Chaignat CL, Barreto A, Songane FF, Clemens JD. 2005. Effectiveness of mass oral cholera vaccination in Beira, Mozambique. *N Engl J Med*. 8:757-767.

Chen KS, Strober W. 1990. Cholera holotoxin and its B subunit enhance Peyer's patch B cell responses induced by orally administered influenza virus: disproportionate cholera toxin enhancement of the IgA B cell response. *Eur J Immunol*. 2:433-436.

Chudwin DS. 1989. Prophylaxis and treatment of pneumococcal bacteremia by immune globulin intravenous in a mouse model. *Clin Immunol Immunopathol*. 1:62-71.

Clerfant P, Seif I. 1984. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins. *Nature*. 311:276-279.

Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mittchnat S, Weinberg RA. 1992. **The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling.** Trends Biochem Sci. 8:312-315.

Cox GJ, Zamb TJ, Babiuk LA. 1993. **Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA.** J Virol. 9:5664-5667.

Cryz SJ, Gluck R. 1998. **Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes as a novel antigen delivery system.** Dev Biol Stand. 92:219-223.

Czerkinsky C, Russell MW, Lyche N, Lindblad M, Holmgren J. 1989. **Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues.** Infect Immun. 4:1072-1077.

Davin JC, Senterre J, Mahieu PC. 1991. **The high lectin-binding capacity of human secretory IgA protects nonspecifically mucosa against environmental antigens.** Biol Neonate. 59:121-125.

Dertzbaugh MT, Elson CO. 1993. **Comparative effectiveness of the cholera toxin B subunit and alkaline phosphatase as carriers for oral vaccines.** Infect Immun. 1:48-55.

Dertzbaugh MT, Elson CO. 1993. **Reduction in oral immunogenicity of cholera toxin B subunit by N-terminal peptide addition.** Infect Immun. 2:384-390.

Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. 1995. **Protective efficacy of intramuscular immunization with naked DNA.** In: **DNA vaccines a new era in vaccinology.** Ann N Y Acad Sci. 772: 40-45.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Howler E. 1989. **The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product.** Science. 4893:934-937.

Edelman R. 2002. **The development and use of vaccine adjuvants.** Mol Biotechnol. 2: 129-148.

Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. 1997. **Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses.** J Virol. 3:2449-2456.

Fazio VM, Ria F, Franco E, Rosati P, Cannelli J, Signori E, Parrella P, Zaratti L, Iannace E, Monego J, Blogna S, Fioretti D, Iurescia S, Filippetti R, Rinaldi M. 2004. **Immune response at birth, long-term immune memory and 2 years follow-up after immunization.** Gene Ther. 6:544-551.

Fields BN, KnipeDM, Howell PM. 1996. **Fields Virology 3<sup>rd</sup> edition.** Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, USA. 2045-2076, 2089-2101.

Fries LF, Gordon DM, Schneider I, Beier JC, Long GW, Gross M, Que JU, Cryz SJ, Sadoff JC. 1992. **Safety, immunogenicity, and efficacy of a Plasmodium falciparum vaccine comprising a circumsporozoite protein repeat region peptide conjugated to Pseudomonas aeruginosa toxin A.** Infect Immun. 5:1834-1839.

Ganong WF. 1991. **Review of Medical Physiology 15<sup>th</sup> Ed.** Appleton & Lange. Connecticut, USA.

Gissmann L, Osen W, Muller M, Jochmus I. 2001. **Therapeutic vaccines for Human Papillomaviruses.** *Intervirology.* 2-3:167-175.

Godfroid F, Denoel P, de Grave D, Schuerman L, Poolman J. 2004. **Diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) combination vaccines and evaluation of pertussis immune responses.** *Int J Med Microbiol.* 5:269-276.

Goodman JW. 1991. **The Immune Response.** In: **Basic and Clinical Immunology 7<sup>th</sup> Ed.** Appleton & Lange. USA. 34-44.

Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. 1993. **Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins.** *J Virol.* 1:315-322.

Hagensee ME, Koutsky LA, Lee SK, Grubert T, Kuypers J, Kiviat NB, Galloway DA. 2000. **Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) capsid antigens in relation to detection of HPV-16 DNA and cervical lesions.** *J Infect Dis.* 4: 1234-1239.

Harro C, Lowy D. 2001. **A vaccine against HPV16, the most prevalent strain of the human papillomavirus found in cervical cancers, has passed phase I clinical trials.** *J Nat Cancer Ins.* 93:184-292.

Hassette DE, Zhang J, Slifka M, Whitton JL. 2000. Immune responses following neonatal DNA vaccination are long-lived, abundant, and qualitatively similar to those induced by conventional immunization. *J Virol.* 6:2620-2627.

Hilleman MR. 1993. Hepatitis and hepatitis A vaccine: a glimpse of history. *J Hepatol.* 2:S5-10.

Hilleman MR. 2000. Overview of vaccinology with special reference to papillomavirus vaccines. *J Clin Virol.* 19:79-90.

Hilleman MR. 2003. Overview of vaccinology in historic and future perspective: the whence and whither of a dynamic science with complex dimensions. In *DNA vaccines*. Eureka.com and Kluwer Academic/ Plenum Publishers.

Hirabayashi Y, Tamura SI, Susuki Y, Nagamine T, Aizawa C, Shimada K, Murata T. 1991. H-2-unrestricted adjuvant effect of cholera toxin B subunit on murine antibody responses to influenza virus haemagglutinin. *Immunology.* 3:329-335.

Holmes RK, Vasil ML, Finkelstein RA. 1975. Studies on toxigenesis in *Vibrio cholerae*. III. Characterization of nontoxinogenic mutants *in vitro* and in experimental animals. *J Clin Invest.* 3:551-560.

Holmgren J. 1981. Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature.* 5822:413-417.

Hörnquist E, Nils L, Czerkinsky C, Holmgren J. 1994. **Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen carrier systems.** In: **novel delivery systems for oral vaccines.** CRC Press Inc. USA. 157-174.

Huges FJ Romanos MA. 1993. **E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase.** *Nucleic Acids Res.* 25:5817-5823.

Huygen K, Ulmer JB, Montgomery DL, Liu MA, Content J. 1995. **Immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine containing genes encoding the components of the secreted antigen 85 complex.** *J Cell Biochem.* 19B:94.

Israel MA, Chan HW, Hourihan SL, Rowe WP, Martin MA. 1979. **Biological activity of polyoma viral DNA in mice and hamsters.** *J Virol.* 3:990-996.

Jenner E. 1798. **An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease known by cow pox.** London: Low.

Jertborn M, Svennerholm, AM, Holmgren J. 1992. **Safety and immunogenicity of an oral recombinant cholera B subunit-whole cell vaccine in Swedish volunteers.** *Vaccine.* 2:130-132.

Johansson EL, Rask C, Fredriksson M, Eriksson K, Czerkinsky C, Holmgren J. 1998. **Antibodies and antibody-secreting cells in the female genital tract after vaginal or intranasal immunizations with cholera toxin B subunit or conjugates.** *Infect Immun.* 2:514-520.

Keefe MC, Wolff M, Gorse GJ, Graham BS, Corey L, Clements-Mann ML, VeraniKetter N, Erb S, Smith CM, Belshe RB, Wagner LJ, McElrath MJ, Schwartz DH, Fast P. 1997. **Safety profile of phase I and II preventive HIV type 1 envelope vaccination: experience of the NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group.** AIDS Res Hum Retroviruses. 14:1163-1177.

Kim PH, Kagnoff MF. 1990. **Transforming growth factor  $\beta$ 1 increases IgA isotype switching at the clonal level.** J Immunol. 11:3773-3778.

Kotloff KL, Sztein MB, Wasserman SS, Losonsky GA, DiLorenzo SC, Walker RI. 2001. **Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell Helicobacter pylori vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection.** Infect Immun. 6:3581-3590.

Koutsky L. 1997. **Epidemiology of genital human papillomavirus infection.** Am J Med. 5A:3-8.

Laiminis LA. 1993. **The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer.** Infect Agents Dis. 2: 74-86.

Lehtinen M, Kibur M, Luostarinen T, Anttila A, Pukkala E. 2000. **Prospects for phase III-IV HPV vaccination trials in the Nordic countries and in Estonia.** J Clin Virol. 1-2:113-122.

Lencer WI, Tsai B. 2003. **The intracellular voyage of cholera toxin: going retro.** Trends Biochem Sci. 12:639-645.



Leszek K, Bory S, Man S. 2000. **Vaccinia-based human papillomavirus vaccines in cervical cancer. Cancer vaccines and immunotherapy.** Cambridge University Press. United Kingdom. 62-81.

Lewin B. 2000. **Genes VII.** Oxford University Press. New York, USA.

Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. 1996. **Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility Class II presentation of tumor antigen.** Cancer Res. 1:21-26.

Liu MA. 1995. **Overview of DNA vaccines.** Ann N Y Acad Sci. 772: 15-20.

Liu MA, Ulmer JB. 2000. **Gene-Based Vaccines.** Molecular Ther. 6:497-500.

Lockman H, Kaper JB. 1983. **Nucleotide sequence analysis of the A2 and B subunits of Vibrio cholerae enterotoxin.** J Biol Chem. 258:13722-13726.

Lowell GH. 1997. **Proteosomes for improved nasal, oral, or injectable vaccines.** In: **new generation vaccines.** New York, Inc. 193-206.

Lowy DR, Frazer IH. 2003. **Candidate prophylactic vaccines based on papillomavirus L1 virus-like particles (VLP's) are currently in human clinical trials.** J Natl Cancer Inst Monogr. 31:111-116.

Lucas ME, Deen JL, von Seidlein L, Wang XY, Ampuero J, Puri M, Ali M, Ansaruzzaman M, Amos J, Macuamule A, CAvailler P, Guerin PJ, Mahoudeau C, Kahozi-Zangwa P,

Lycke N, Holmgren J. 1986. **Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens.** Immunology. 2:301-308.

MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, BAgarazzi ML, Chattergoon MA, Baine Y, Higgins TJ, Ciccarelli RB, Coney LR, Ginsberg RS, Weiner DB. 1998. **First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response.** J Infect Dis. 1:92-100.

Makela PH. 1995. **Vaccines against Haemophilus influenzae type b.** In: **molecular and Clinical Aspects of Bacterial Vaccine Development.** John Wiley and Sons. 41–91.

Makela PH. 2000. **Vaccines, coming of age after 200 years.** FEMS Microbiol Rev. 1:9-20.

McAleer WJ. Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. 1992. **Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast.** 1984. Biotechnology. 24:500-502.

Minor PD. 1995. **Regulatory issues in the use of DNA vaccines.** In: **DNA vaccines, a new era in vaccinology.** Ann N Y Acad Sci. 772:170-177.

Moldoveanu Z, Love-Homan L, Huang WQ, Krieg Am. 1998. **CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus.** Vaccine. 11-12:1216-1224.

Morris S, Kelley C, Howard A, Li Z, Collins F. 2000. **The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis.** Vaccine. 20:2155-2163.

Neutra MR, Phillips TL, Mayer EL, Fishkind DJ. 1987. **Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch.** Cell Tissue Res. 3:537-546.

Osen W, Jochmus I, Muller M, Gissmann L. 2000. **Immunization against human papillomavirus infection and associated neoplasia.** J Clin Virol. 1-2:75-78.

Paavonen J, Halttunen M, Hansson BG, Nieminen P. 2000. **Prerequisites for human papillomavirus vaccine trial: results of feasibility studies.** J Clin Virol. 1-2:25-30.

Pachuk CJ, McCallus DE, Weiner DB, Satishchandran C. 2000. **DNA vaccines-challenges in delivery.** Curr Opin Mol Ther Apr; 2: 188-198.

Park TW, Fujiwara H, Wright TC. 1995. **Molecular Biology of cervical cancer and its precursors.** Cancer. 10 Suppl:1902-1913.

Petersen JS, Bregenholt S, Apostolopoulos V, Homann D, Wolfe T, Hughes A, De Jongh K, Wang M, Dyrberg T, Von Herrath MG. 2003. **Coupling of oral human or porcine insuline to the B subunit of cholera toxin (CTB) overcomes critical antigenic differences for prevention of type I diabetes.** Clin Exp Immunol. 1:38-45.

Piccini A, Storey A, Massimi P, Banks L. 1995. **Mutations in the human papillomavirus type 16 E2 protein identify multiple regions of the protein involved in binding to E1.** J Gen Virol. 11:2909-2913.

**Poliomyelitis prevention in the United States: Introduction of sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine.** Recommendations of the Advisory committee on Immunization Practices (ACIP) MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1997;46(RR-33): 1–25.

Pyeong-Hyeun K, Eckmann L, Lee WJ, Han W, Kagnoff MF. 1998. **Cholera toxin and cholera toxin B subunit induce IgA switching through the action of TGF- $\beta$ 1.** J Immunol. 160:1198-1203.

Qadri F, Wenneras C, Ahmed F, Asaduzzaman M, Saha D, Albert MJ, Sack RB, Svennerholm A. 2000. **Safety and immunogenicity of an oral, inactivated enterotoxigenic Escherichia coli plus cholera toxin B subunit vaccine in Bangladeshi adults and children.** Vaccine 24: 2704-2712.

Rai Chowdhuri AN, Bhatia R, Ichhpujani RL. 1984. **Immunoprophylaxis against rabies.** J Commun Dis. 1:43-48.

Ramachandran R. 1998. **A new era of vaccine technology.** Frontline, India's National Magazine. 15-24.

Ramon G. 1925. **Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique.** Bull Soc Centr Med Vet. 101:227-234.

Ramon G. 1926. **Procedes pour accroitre la production des antitoxines.** Ann Inst Pasteur. 40: 1-10.

Randall D, Burggren W, French K. 1997. **Eckert Animal Physiology Mechanisms and Adaptations 4<sup>th</sup> Ed.** W.H. Freeman and Company. New York, USA.

Rask C, Fredriksson M, Lindblad M, Czerkinsky C, Holmgren J. 2000. **Mucosal and systemic antibody responses after peroral or intranasal immunization: effects of conjugation to enterotoxin B subunits and/or of co-administration with free toxin as adjuvant.** APMIS. 3:178-186.

Rocha-Zavaleta L, Alejandre JE, Garcia-Carranca A. 2002. **Parenteral and oral immunization with a plasmid DNA expressing the human papillomavirus 16-L1 gene induces systemic and mucosal antibodies and cytotoxic T lymphocyte responses.** J Med Virol. 66:86-95.

Rudin A, Riise GC, Holmgren J. 1999. **Antibody responses in the lower respiratory tract and male urogenital tract in humans after nasal and oral vaccination with cholera toxin B subunit.** Infect Immun. 67:2884-2990.

Rudolf M. 2000. **Vaccine delivery and immunosuppression in cervical cancer.** Cancer vaccines and immunotherapy. Cambridge University Press. United Kingdom. 82-106.

Sánchez-Vizcaíno. 2003. **Guiones de Inmunología.** Capítulo 24.

Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P, Hoffman SL. 1994. **Protection against malaria by immunization with circumsporozoite protein plasmid DNA.** Proc Natl Acad Sci USA. 21:9866-9870.

Shen X, Lagergard T, Yang Y, Lindblad M, Fredriksson M, Holmgren J. 2000. **Systemic and mucosal immune responses in mice after mucosal immunization with group B streptococcus type III capsular polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugated vaccine.** *Infect Immun.* 10:5749-5755.

Spangler BD. 1992. **Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin.** *Microbiol Rev.* 4:622-647.

Stern P, Beverley P, Carol M. 2000. **Immunity and cancer.** In: **cancer vaccines and immunotherapy.** Cambridge University Press. United Kingdom. 1-16.

Switzer R, Garrity L. 1999. **Experimental Biochemistry.** W.H. Freeman and Company. New York.

Tacket CO, Reid RH, Boedeker EC, Losonsky G, Nataro JP, Bhagat H, Edelman R. 1994. **Enteral immunization and challenge of volunteers given enterotoxigenic E. coli CFA/II encapsulated in biodegradable microspheres.** *Vaccine.* 14:1270-1274.

Tacket CO, Roy MJ, Widera G, Swain WF, Broome S, Edelman R. 1999. **Phase I safety and immune responses studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device.** *Vaccine.* 22:2826-2829.

Taylor DN, Cardenas V, Sánchez JL, Begue RE, Gilman R, Bautista C, Perez J, Puga R, Gaillour A, Meza R, Echeverria P, Sadoff J. 2000. **Two-year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit in Peru.** *J Infect Dis.* 5:1667-1673.

Tecnología de las Vacunas en el siglo XXI. 1998. **Suplemento del compendio de Educación Continua para Veterinarios**. 20:8(C).

Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A. 1993. **Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein**. Science. 5102:1745-1749.

Valdespino-Gómez V, Valdespino-Castillo V. 2004. **Perspectivas actuales en el estudio y en la atención de las pacientes con cáncer cervicouterino**. Ginecol Obstet Mex. 72:29-38.

Wang B, Ugen KE, Srikantan V, Agadjanyan MG, Dang K, Refaeli Y, Sato AI, Boyer J, Williams WV, Weiner DB. 1993. **Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type I**. Proc Natl Acad Sci USA. 9:4156-4160.

Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Koonan KM, Charoenvit Y, Jones TR, Hobart P, Margalith M, Ng J, Weiss WR, Sedegah M, de Taisne C, Norman JA, Hoffman SL. 1998. **Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine**. Science. 5388:476-480.

Werness BA, Levine AJ, Howell PM. 1990. **Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53**. Science. 248:76-79.

Will H, Cattaneo R, Koch HG, Darai G, Schaller H, Schellekens H, van Eerd PM, Deinhardt F. 1982. **Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees**. Nature. 5885:740-742.

William EP. 1993. **Fundamental Immunology**. Raven Press, Ltd., New York. Third Edition.

Wolf HM, Fischer MB, Puhringer H, Samstag A, Vogel E, Eibl MM. 1994. **Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$  interleukin-6) in human monocytes**. *Blood* 5:1278-1288.

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. 1990. **Direct gene transfer into mouse muscle in vivo**. *Science* 4949 Pt 1:1465-1468.

Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J, Ertl HC. 1994. **Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus**. *Virology*. 1:132-140.

Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW. 2001.  **$\alpha_6$  Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP**. *Biochem Biophys Res Commun*. 3:668-673.

Zur-Hausen H, de Villiers EM. 1994. **Human papillomaviruses**. *Annu Rev Microbiol*. 48: 427-447.

Zur-Hausen H. 2000. **Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis**. *J Natl Cancer Inst*. 9:690-698.

<http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/mex/productos/7783.htm>

<http://www.salud.gob.mx/>



## Cholera Toxin B-Subunit Gene Enhances Mucosal Immunoglobulin A, Th1-Type, and CD8<sup>+</sup> Cytotoxic Responses When Coadministered Intradermally with a DNA Vaccine

Alba E. Sanchez,<sup>1</sup> Guillermo Aquino,<sup>1</sup> Pedro Ostoa-Saloma,<sup>2</sup> Juan P. Lacleste,<sup>2</sup>  
and Leticia Rocha-Zavaleta<sup>1\*</sup>

Department of Molecular Biology and Biotechnology<sup>1</sup> and Department of Immunology,<sup>2</sup> Institute of Biomedical Research, National University of Mexico, Mexico, D.F. 04510, Mexico

Received 3 November 2003/Returned for modification 2 February 2004/Accepted 18 March 2004

A plasmid vector encoding the cholera toxin B subunit (pCtB) was evaluated as an intradermal genetic adjuvant for a model DNA vaccine expressing the human papillomavirus type 16 L1 capsid gene (p16L1) in mice. p16L1 was coadministered with plasmid pCtB or commercial polypeptide CtB as a positive control. Coadministration of pCtB induced a significant increment of specific anti-L1 immunoglobulin A (IgA) antibodies in cervical secretions ( $P < 0.05$ ) and fecal extracts ( $P < 0.005$ ). Additionally, coadministration of pCtB enhanced the production of interleukin-2 and gamma interferon by spleen cells but did not affect the production of interleukin-4, suggesting a Th1-type helper response. Furthermore, improved CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated cytotoxic activity was observed in mice vaccinated with the DNA vaccine with pCtB as an adjuvant. This adjuvant effect was comparable to that induced by the CtB polypeptide. These results indicate that intradermal coadministration of pCtB is an adequate means to enhance the mucosa-, Th1-, and CD8<sup>+</sup>-mediated cytotoxic responses induced by a DNA vaccine.

Cholera toxin (CT), the enterotoxin produced by *Vibrio cholerae*, is a potent immunoadjuvant (26). CT is composed of two structurally and functionally different subunits, the toxic A subunit (CtA) and the cell-binding B subunit (CtB). Biologically active CtB assembles into pentamers and binds with a high affinity to the cellular receptor GM<sub>1</sub> ganglioside (35), which is expressed by a wide range of nucleated cells, including epithelial cells, lymphocytes, and antigen-presenting cells (APCs). CtB is recognized as a mucosal adjuvant itself (12). When CtB is applied simultaneously with heterologous antigens, it induces the stimulation of a mucosal response to the admixed antigen (15).

The adjuvant capacity of CT for orally administered antigens has long been recognized (26). More recently, CtB has been used to enhance immune responses to antigens delivered by novel immunization routes (16, 20). In particular, application of CtB onto mouse skin has been proved to induce potent humoral and cellular responses against the coadministered antigen (1).

The use of DNA vaccines represents a novel strategy for the induction of specific mucosal immune responses. Like traditional vaccines, the ability of DNA vaccines to elicit mucosal responses can potentially be improved by the use of adjuvants. Coadministration of CT has been used to increase the specific immunoglobulin G (IgG) (8) and mucosal IgA (24) responses mediated by DNA vaccines. However, the use of CtB alone as an adjuvant for DNA vaccines is still limited. In addition, use of the CT-coding sequences as genetic adjuvants for DNA

vaccines has recently been proposed as an innovative approach that has produced promising results (2) and that deserves further investigation.

Plasmid DNA encoding suitable antigens can readily and economically be constructed and produced in large quantities. The final product retains an intrinsic characteristic of DNA: stability. This is of particular interest for vaccines meant to be applied in developing countries, since it would reduce the need for costly cold storage. For that reason, designing and testing of plasmids containing coding sequences with the potential of enhancing responses against DNA vaccines is an attractive approach nowadays.

In the present work we investigated the capacity of the CtB-coding sequence to enhance the humoral and cellular responses mediated by a DNA vaccine. To do this, a plasmid containing the CtB gene was constructed and used as an adjuvant for a model DNA vaccine containing the L1 gene from human papillomavirus (HPV) type 16 (HPV-16) (32). Mice were immunized intradermally with the DNA vaccine and the plasmid expressing CtB (pCtB), commercial CtB polypeptide, CT holotoxin, or a translational fusion plasmid expressing a biologically inactive CtB. Our study showed that coadministration of pCtB enhances the production of fecal and genital IgA antibodies. Furthermore, pCtB induced a Th1-type response associated with an increment on CD8<sup>+</sup> T-cell-specific cytotoxic activity against L1-expressing cells. The adjuvant capacity of pCtB was comparable to that of the CtB polypeptide. The fusion plasmid did not show adjuvant activity. These results suggest that the plasmid expressing the CtB gene can be used as a strong adjuvant for intradermally administered DNA vaccines not only to enhance mucosal responses but also to improve Th1-mediated cellular responses.

\* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Depto. Biología Molecular y Biotecnología, UNAM, Circuito Escolar s/n, Ciudad Universitaria, Apdo. Postal 70228, México D.F. CP 04510, Mexico. Phone: (52 55) 56 22 38 76. Fax: (52 55) 56 22 38 55. E-mail: lrochaz@servidor.unam.mx.

## MATERIALS AND METHODS

**Construction of plasmids.** All reagents used for the isolation and amplification of DNA were purchased from Gibco BRL (Life Technologies Inc., Gaithersburg, Md.). Genomic DNA was isolated from cultures of the *V. cholerae* El Tor biotype and was used as the template for PCRs. The complete sequence coding for the enterotoxin B-subunit mature polypeptide was amplified with the following oligonucleotides: CtBF (5'-TCA GGC GGC CGC CAT ATG CAC ATG AGG CAC CT-3') and CtBR (5'-TCA GTC TAG ATT AAT TTG CCA TAC TAA TTG C-3'). To facilitate cloning, NotI and XbaI restriction sites were incorporated into primers CtBF and CtBR, respectively; the sequences are shown in italics. The primers were designed to amplify a fragment spanning from position 187 to position 512 (GenBank accession no. K01170) (25). Amplified fragments were digested with NotI and XbaI to generate cohesive ends and inserted into the NotI and XbaI sites of the pCDNA3 expression vector (Invitrogen Co., La Jolla, Calif.), under the control of the human cytomegalovirus immediate-early promoter, to generate plasmid pCtB.

The L1 gene was amplified from a wild-type HPV-16 genome by PCR with the following oligonucleotides: L1F (5'-CGG TAC CTA GTT CCA GGT CTC CAC-3') and L1R (5'-CCT CGA GAT ATA CAC AAC CAA ACA AC-3'). Primers L1F and L1R amplify a 1,672-bp fragment containing the entire L1-coding sequence. Recognition sites for KpnI and XhoI were incorporated into primers L1F and L1R, respectively, and are indicated in italics. Amplified L1 fragments were digested with KpnI and XhoI and inserted into the corresponding sites of the pCDNA3 vector to create the p16L1 expression construct.

The L1 gene was also amplified with the L1F and L1R' oligonucleotides. Use of primer L1R' (5'-CGC GGC CGC GCGT TTA CCA GTT GA GAG-3') leads to the amplification of a truncated L1 sequence (1,612 bp) that lacks the natural termination signal. A NotI site was incorporated into L1R' and is indicated in italics. The truncated L1 fragment was subcloned into the KpnI and NotI sites of plasmid pCtB to generate translational fusion plasmid pL1B.

The integrity of the DNA of the CtB and L1 inserts from all constructs was corroborated by sequencing with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE (Applied Biosystems, Foster City, Calif.).

**In vitro plasmid expression.** B16FO cells (a murine melanoma-derived cell line) were transfected with plasmid p16L1, pCtB, or pL1B (all of which express a neomycin [G418] resistance gene) by using the FuGENE 6 transfection reagent (Roche Diagnostics, Mannheim GmbH, Germany). B16FO cells ( $3 \times 10^5$ ) were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U of penicillin per ml, and 100 µg of streptomycin per ml at 37°C for 24 h. The FuGENE reagent (10 µl) was mixed with 200 µl of serum-free DMEM and incubated for 5 min at room temperature. Plasmid DNA (1.5 µg) was diluted in 100 µl of serum-free DMEM, gently mixed with the FuGENE reagent solution, and incubated for 15 min at room temperature. Supplemented DMEM (200 µl) was added to the FuGENE reagent-DNA mixture and added dropwise to the cells growing in 2.5 ml of supplemented DMEM. The cells were incubated for 48 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. G418 was then added at a final concentration of 2 mg/ml. Transfected cells were maintained under continuous selective pressure for 3 to 4 weeks. Expression of the L1 and CtB proteins was studied by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 10 and 14% polyacrylamide gels, respectively. A total of  $10^6$  cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) three times. The cell pellets were diluted 1:1 in double-strength sample buffer 120 mM Tris [pH 6.8], 0.1% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 1% bromophenol blue, 100 mM dithiothreitol (DTT) and boiled for 3 min. Samples along with molecular weight markers were resolved by electrophoresis (Life Technologies Inc.). After electrophoresis, the proteins were electroblotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites were saturated by incubating the membrane overnight at 4°C in Tris-buffered saline (TBS; 10 mM Tris [pH 7.5], 0.9% NaCl) containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.01% sodium azide. The L1 protein was detected by using a rabbit antipapillomavirus antibody (Dako Co., Carpinteria, Calif.) and the CT B subunit was detected with a rabbit anti-CT antibody (Sigma, St. Louis, Mo.), which was used as a probe to react with the B subunit of CT (Sigma), by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). After incubation with alkaline phosphatase-conjugated swine anti-rabbit secondary antibody (Dako Co.), the bands were developed by incubation with Sigma Fast 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-Nitro Blue Tetrazolium alkaline phosphatase substrate (Sigma).

**In vivo plasmid expression.** B16FO (*H-2<sup>d</sup>*) cells ( $10^5$ ) were inoculated intradermally into the backs of C57BL/6 (*H-2<sup>b</sup>*) mice, and the mice were monitored for tumor formation. Twenty days after inoculation, the tumors were transfected by injection with 100 µg of plasmid p16L1, pCtB, or pL1B. The mice were killed 48 h after plasmid injection, the tumors were recovered, and 100-mg tumor

samples were obtained and homogenized in 1 ml of Trizol reagent (Life Technologies Inc.) with a power homogenizer. Total RNA was purified by phenol-chloroform separation and isopropyl alcohol precipitation. Specific RNA sequences were reverse transcribed to cDNA and then amplified by PCR with the SuperScript One-Step RT-PCR system (Life Technologies Inc.). The mRNA sequence specific for HPV-16 L1 was amplified with primers L1F (5'-CTA GTT CCA GGT CTC CAC-3') and L1R (5'-CAT ATA CAC AAC CAA ACA AC-3'), and the CtB mRNA sequence was amplified with primers CtBF (5'-TCA CAT ATG CAC ATG AGG CAC CT-3') and CtBR (5'-TCA GAT AAT TTG CCA TAC TAA TTG C-3'). mRNA from pL1B-transfected cells was amplified by using primers L1F and L1R, primers CtBF and CtBR, or primers L1F and CtBR.

**GM<sub>1</sub> ganglioside-binding assay.** For the GM<sub>1</sub> ganglioside-binding assay, cultures of pCtB- and pL1B-transfected B16FO cells, which had been maintained continuously under selective pressure with G418 for more than 4 weeks, were used. The cells ( $10^6$ ) were washed three times with ice-cold PBS. The cells were resuspended in lysis buffer containing protease inhibitors (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 1% Triton X-100, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg of aprotinin per ml, 10 µg of pepstatin per ml, 100 µg of leupeptin per ml). Cell lysates were concentrated with an Amicon Centriprep-10 concentrator (Millipore Corp., Billerica, Mass.) and diluted in PBS to a final concentration of 5 µg/ml. The binding assay was performed basically as described elsewhere (40). Ninety-six-well low-binding polystyrene plates were coated with 100 µl of 2 µM GM<sub>1</sub> ganglioside (Sigma) in PBS at room temperature overnight. During this time the plates were covered to avoid evaporation. After the plates were washed four times with PBS, nonspecific binding sites were blocked with 200 µl of 2% BSA in PBS for 2 h at 37°C. After the plates were washed, increasing concentrations of either cell lysates or CtB polypeptide (Sigma) diluted in PBS containing 2% BSA were added. Nontransfected cell lysates were included as negative controls. To inhibit the assembly of B subunits into pentamers, the reducing agent DTT was added to samples of cell lysates and CtB before the samples were added to the plates. After incubation at 37°C for 2 h, bound proteins were detected by using a rabbit anti-CT antibody (Sigma), followed by an anti-rabbit alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (Dako Co.). The color reaction was stopped by the addition of 50 µl of 3 M NaOH, and the absorbance at 450 nm was determined and recorded. The mean values from four independent experiments are reported.

**Mice, immunization, and sample collection.** Animals were used in accordance with the Research Animals Use and Care Guidelines of the Institute of Biomedical Research. Groups of female C57BL/6 mice (age, 6 to 8 weeks) were immunized intradermally on days 0 and 14 with p16L1 (100 µg), pCtB (100 µg), pL1B (100 µg), commercial CtB polypeptide (10 µg; Sigma), or commercial CT holotoxin (10 µg; Sigma). An additional group was immunized with 100 µl of sterile, contaminant-free PBS (Roche Diagnostics) as a negative control. For the adjuvant capacity study, mice received 100 µg of p16L1 coadministered with either different concentrations of pCtB (1, 10, 100, 250, or 500 µg), 10 µg of CtB polypeptide, or 10 µg of CT. Cervical secretions were collected by washing the genital tract three times with 30 µl of sterile, contaminant-free PBS. Secretions were cleared of cell debris and tissue fragments by centrifugation at  $13,000 \times g$  for 5 min and were stored at -70°C. Fecal pellets were collected and weighed; the final volume was adjusted to 100 mg/ml with PBS containing 0.01% sodium azide. Fecal pellets were suspended by shaking with a vortex mixer (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, Iowa) and cleared of fecal debris by centrifugation at  $13,000 \times g$  for 5 min, and the supernatants were collected and stored at -70°C. Spleens were obtained from mice that had been killed by cervical dislocation, and spleen cells were extracted by perfusion with RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U of penicillin per ml, and 100 µg of streptomycin per ml and used immediately.

**Detection of antibodies by ELISA.** The presence of antibodies was determined by ELISA with either baculovirus-derived HPV-16 virus-like particles (VLPs; kindly provided by John Schiller, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) or commercial CtB. Extraction and purification of VLPs have been described elsewhere (7). Plates were coated overnight at 4°C with 500 ng of either purified VLPs or CtB diluted in 100 µl of PBS per well. The plates were washed four times with TBS-T (6.5 g of Tris base per liter, 27.5 g of NaCl per liter, 0.1% Tween 20). Nonspecific binding sites were blocked by adding 200 µl of blocking solution (TBS-T containing 2% BSA) to each well for 2 h at 37°C. Cervical secretions and fecal samples were diluted 1:10 in blocking solution. All samples were serially diluted twofold down the microtiter plate. Bound antibodies were detected with anti-mouse IgA-alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (Dako Co.). Endpoint titers were defined as the reciprocal of the highest dilution with an absorbance value greater than three times the mean absorbance value for the control mice vaccinated with PBS. Samples from nonresponders were assigned a value of one-half the lowest dilution tested.

**Determination of IL-2, IFN- $\gamma$ , and IL-4 production.** A total of  $10^6$  spleen cells were stimulated with purified HPV-16 VLPs for 48 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U of penicillin per ml, 100  $\mu$ g of streptomycin per ml, and 2 mM L-glutamine. Conditioned medium was collected at 12, 24, and 48 h poststimulation. Medium was cleared from the particulate matter by centrifugation and was assayed immediately. The concentrations of interleukin-2 (IL-2), gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), and IL-4 were determined with a ChemiKine Human Interleukin-2, IFN- $\gamma$ , or Interleukin-4 sandwich ELISA kit (Chemicon International, Temecula, Calif.), according to the instructions of the manufacturer. All medium samples were assayed in duplicate. Conditioned medium from nonstimulated cells was included as a negative control.

**CTL assay.** Spleen cells were cultured at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U of penicillin per ml, 100  $\mu$ g of streptomycin per ml, 10 U of IL-2 (Life Technologies Inc.) per ml, and 2 mM L-glutamine. A total of  $10^6$  splenocytes were restimulated with purified HPV-16 VLPs for 5 days. The cytotoxic T-lymphocyte (CTL) assay was performed in 96-well round-bottom plates with HPV-16 L1-expressing B16FO cells as the target; untransfected B16FO cells were used as controls. Restimulated splenocytes were incubated with  $10^4$  target cells for 4 h at different effector cell/target cell ratios. Cytotoxicity was evaluated by measuring the activity of cytosolic lactate dehydrogenase, which is released upon cell lysis, by the Cytotox 96 nonradioactive cytotoxicity assay (Promega Co., Madison, Wis.), according to the instructions of the manufacturer. The maximum levels of release of lactate dehydrogenase from effector cells and target cells were measured for inclusion in cytotoxicity calculations. The absorbance values for the background control (culture medium) were subtracted from all experimental and control values. Corrected absorbance values were used to calculate the percent cytotoxicity by the following formula: [(experimental release - effector cell spontaneous release - target cell spontaneous release)/(target maximum release - spontaneous release)]  $\times$  100. The final cytotoxicity value represents the mean for 10 individual mice per group.

**Proliferation assay.** A total of  $2 \times 10^5$  spleen cells were seeded in triplicate wells of 96-well round-bottom plates in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U of penicillin per ml, 100  $\mu$ g of streptomycin per ml, and 2 mM L-glutamine and incubated in the presence or absence of purified HPV-16 VLPs for 5 days at 37°C. During the final 18 h of culture the cells were pulsed with 1  $\mu$ Ci of tritiated thymidine (Amersham, Arlington Heights, Ill.) per well. The cells were harvested onto fiberglass filters (Schleicher & Schuell, Inc., Keene, N.H.), which were  $^3$ H to dry overnight before liquid scintillation counting (EcoLume; ICN, Costa Mesa, Calif.). The stimulation index was calculated as the mean number of counts for the VLP-stimulated cells divided by the mean number of counts for the nonstimulated cells.

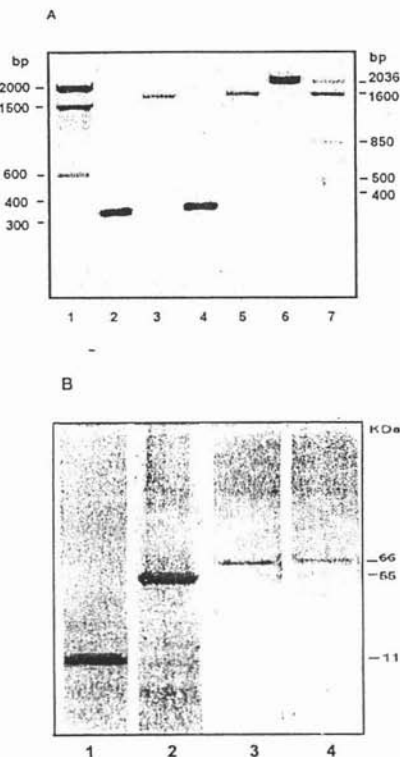
**Depletion of T-lymphocyte subpopulations.** Columns and reagents were purchased from Miltenyi Biotec GmbH (Glabach, Germany), and antibodies were purchased from Pharmingen (Becton Dickinson Co., San Jose, Calif.). Paramagnetic microbeads conjugated to either monoclonal rat anti-mouse CD8a (Ly-2) or rat anti-mouse CD4 (L3T4) antibodies were used to deplete CD8 $^+$  and CD4 $^+$  cells, respectively. A total of  $10^8$  antigen-activated splenocytes were resuspended in 90  $\mu$ l of PBS supplemented with 2 mM EDTA and 0.5% BSA (column buffer), and the mixture was incubated with 10  $\mu$ l of paramagnetic microbeads for 15 min at 4°C. Magnetically labeled cells were washed with 2 ml of column buffer by centrifugation at 2,500  $\times$  g for 5 min, and  $10^7$  cells were resuspended in 500  $\mu$ l of degassed column buffer. LS+ columns were attached to a magnet and activated with 3 ml of degassed column buffer; cells were applied to the column, and effluent was collected and considered either a CD4 $^+$  or a CD8 $^+$ -depleted population.

The efficiency of cell depletion was assessed by flow cytometry with a FACS-Calibur flow cytometer (Becton Dickinson Co.). Subpopulations were determined by using APC-anti-mouse CD3e (CD3  $\epsilon$  chain), phycoerythrin-anti-mouse CD8a (Ly-2), or biotin-anti-mouse CD4 (L3T4) antibodies. Cytometry analysis was performed with the CellQuest program. Only samples with depletion efficiencies  $\geq$ 99% were used for the cytotoxicity assays.

**Statistical analysis.** The Wilcoxon signed-rank test and Student's *t* test were used to analyze the significance of the differences between the experimental and the control groups. All tests were two-tailed, and basic significance was considered a *P* value of 0.05.

## RESULTS

**In vivo and in vitro expression of plasmids.** Plasmids were constructed to encode and deliver the CtB polypeptide from



**FIG. 1.** Analysis of L1 and CtB gene expression in mammalian cells. pCtB, p16L1, or pL1tB was injected directly into B16FO cell-induced tumors in mice (A) or transfected into B16FO cells in vitro (B). Production of specific mRNAs and proteins were analyzed 48 h later. (A) Total RNA was isolated from injected tumor cells; reverse transcribed to cDNA; and then amplified by PCR with CtB-specific (lanes 2 and 4), L1-specific (lanes 3 and 5), or L1 forward-CtB reverse (lane 6) oligonucleotides. Lanes 1 and 7, DNA size markers; lane 2, reverse transcription-PCR products from tumors transfected with pCtB; lane 3, product from tumors transfected with p16L1; lanes 4, 5, and 6, products from tumors transfected with pL1tB. (B) Protein extracts from B16FO cells transfected in vitro with pCtB (lane 1), p16L1 (lane 2), or pL1tB (lanes 3 and 4) were separated by electrophoresis; and proteins were detected after Western blotting with antibodies against the L1 protein (lanes 2 and 3) or the CtB polypeptide (lanes 1 and 4).

*V. cholerae* and the HPV-16 L1 protein into mammalian cells, separate or as part of a fusion. The integrities of the cloned sequences were verified by sequencing the entire genes and flanking vector sequences. In vivo expression of the plasmids was evaluated upon transfection of murine melanoma tumors with either p16L1, pCtB, or pL1tB. RNA was isolated, reverse transcribed into cDNA, and then amplified. A fragment of 325 bp, which corresponded to the expected size of the CtB sequence, was amplified from pCtB-transfected cells (Fig. 1A, lane 2), whereas the entire 1,672-bp L1 gene was amplified from p16L1-transfected cells (Fig. 1A, lane 3). Fragments of

the expected molecular size for CtB and L1 were amplified from pL1tB-transfected cells by using primers specific for CtB (Fig. 1A, lane 4) or L1 (Fig. 1A, lane 5). Furthermore, a fragment of approximately 2,000 bp was amplified from pL1tB-transfected cells (Fig. 1A, lane 6) by using a combination of L1-specific forward primers and CtB-specific reverse primers, indicating that the L1 and CtB genes are transcribed as a single sequence. Expression of the L1 protein and CtB polypeptide was investigated in cells transfected *in vitro* and was demonstrated by Western blotting. Bands of the expected molecular mass for monomeric CtB (11 kDa) and L1 (55 kDa) were detected in protein extracts from cells transfected with plasmids pCtB (Fig. 1B, lane 1) and pL1tB (Fig. 1B, lane 2), which indicates that the proteins were translated *in vitro*. Protein extracts from cells transfected with pL1tB showed the presence of a 66-kDa product that reacted with both anti-L1 (Fig. 1B, lane 3) and anti-CtB (Fig. 1B, lane 4) antibodies, suggesting that the proteins were expressed as a fusion.

**GM<sub>1</sub> ganglioside-binding assay.** In order to bind to its cellular receptor, GM<sub>1</sub> ganglioside, CtB must assemble into pentamers; interestingly, only this biologically active pentameric molecule expresses adjuvant activity (35). The capacity of plasmid-expressed CtB to bind to GM<sub>1</sub> ganglioside was evaluated in the present study. Increasing concentrations of whole-cell protein extracts from cells transfected with plasmid pCtB or pL1tB were assessed in a GM<sub>1</sub> ganglioside-binding assay. Commercial CtB polypeptide was included as a positive control. As shown in Fig. 2A, CtB produced by pCtB-transfected cells bound to GM<sub>1</sub> ganglioside, suggesting that plasmid-produced CtB assembles into pentamers. In this assay, the maximum levels of binding were detected with commercial CtB at a concentration of 100 ng and protein extracts from cells transfected with pCtB at 500 ng. Unlike pCtB, pL1tB-derived CtB showed a significantly lower capacity of binding to GM<sub>1</sub> ganglioside; this suggests that the conformation of the CtB polypeptide was modified by the presence of the fused L1 protein, hampering the expression of a biologically active CtB. As expected, no binding was detected in protein extracts from nontransfected cells. It is known that binding of CtB to GM<sub>1</sub> ganglioside can be inhibited *in vitro* by addition of the reducing agent DTT (5). Therefore, to demonstrate the biological activity of pCtB-derived CtB, a GM<sub>1</sub> ganglioside-binding assay was performed in the presence or absence of DTT with 100 ng of commercial CtB and 500 ng of protein extract from transfected cells. These protein concentrations yielded the maximum levels of binding in the previous assay (Fig. 2A). Binding of both commercial and plasmid-derived CtB was inhibited by the presence of DTT (Fig. 2B). This observation indicates that the CtB produced by the plasmid is biologically active.

**Evaluation of mucosal antibody responses.** Antibodies produced on mucosal surfaces are believed to be the major line of defense against viruses infecting mucosal membranes. HPV-16 infects the anogenital mucosa. Therefore, we first investigated the development of mucosal antibodies in cervical secretions and fecal extracts after intradermal administration of a DNA vaccine against HPV-16. Specific antibodies were not detected in PBS-vaccinated controls (data not shown). Figure 3 shows that IgA antibodies were produced in mice after the initial vaccination. The level of antibodies increased following a boosting inoculation, reaching maximum levels in cervical se-

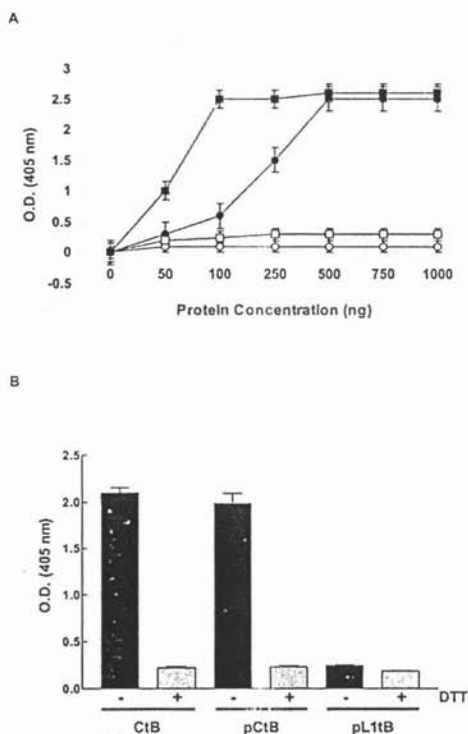


FIG. 2. GM<sub>1</sub> ganglioside binding of CtB produced by plasmids pCtB and pL1tB. (A) Increasing concentrations of either whole-cell protein extracts from cells transfected with pCtB (closed circles), pL1tB (open squares), or commercial CtB (closed squares) were tested by a GM<sub>1</sub> ELISA. Protein extracts from nontransfected cells (open circles) were used as negative controls. (B) The biological activity of plasmid-produced CtB was analyzed by a GM<sub>1</sub> ganglioside-binding assay. A total of 500 ng of protein extracts from cells transfected with plasmid pCtB or pL1tB was tested in the presence or absence of DTT, as indicated. Commercial CtB (100 ng) was included as a positive control. Each point represents the mean of four independent assays. Error bars represent the standard errors of the means. O.D., optical density.

cretions and fecal extracts at days 28 and 32, respectively. IgG antibodies were produced concurrently with the IgA antibody response. Maximal titers of IgG antibodies were detected at day 28, although the magnitude of the response was significantly lower than that of IgA antibodies (for cervical secretions,  $P = 0.001$ ; for fecal extracts,  $P = 0.0001$ ). Our results indicate that vaccination with p16L1 mainly elicits a mucosal IgA response. Therefore, we next evaluated the adjuvant potential of pCtB for the induction of IgA antibodies in cervical secretions and fecal extracts of vaccinated mice. Mice were vaccinated with p16L1 alone or with p16L1 coadministered with commercial CtB, CT, or different concentrations of pCtB. A group of mice was immunized with plasmid pL1tB. As expected, the presence of commercial CtB polypeptide or CT protein induced a significant increment of IgA titers in both

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

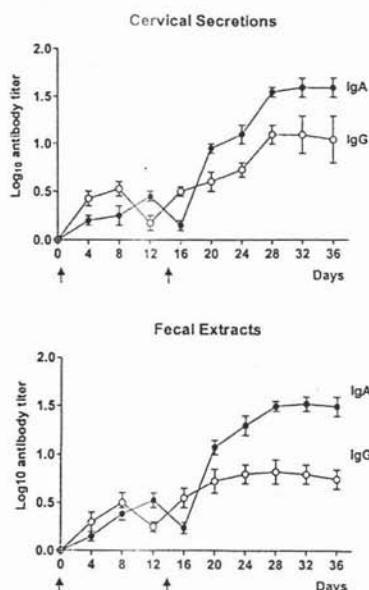


FIG. 3. Kinetics of IgA and IgG responses in cervical secretions and fecal extracts after intradermal immunization with plasmid p16L1. C57BL/6 mice were immunized with 100  $\mu$ g of plasmid p16L1 at the indicated times (arrows). Cervical secretions and fecal extracts were obtained every 4 days and were assayed for the presence of anti-L1 IgA and IgG antibodies by ELISA. Each point represents the mean for 10 mice assayed independently. Error bars indicate standard errors of the means.

cervical secretions ( $P < 0.0001$ ) and fecal extracts ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 4). A dose-dependent adjuvant effect of pCtB was observed. Coadministration of 100  $\mu$ g of pCtB prompted a significant increment in the mean antibody titer induced by plasmid p16L1 alone in both cervical secretions ( $P < 0.0001$ ) and fecal extracts ( $P < 0.0001$ ). At this concentration, pCtB demonstrated an adjuvant capacity comparable to those of the CtB polypeptide and the CT protein (Fig. 4).

It has been demonstrated that bacterial elements of plasmid vectors, such as CpG sequences, have adjuvant effects (23). Therefore, to address the question of whether the adjuvant effect observed was due to these bacterial components, we constructed plasmid pL1tB, which drives the expression of a biologically inactive L1-CtB fusion. Accordingly, the IgA response elicited by the pL1tB fusion plasmid was significantly lower than that produced by coadministration of pL1tB and pCtB, CtB, or CT ( $P < 0.0001$ ). In fact, the response elicited by pL1tB was similar to that produced by immunization with p16L1 alone ( $P > 0.05$ ). These results indicate that the adjuvant effect was due to the presence of functional CtB expressed by pCtB rather than to bacterial adjuvants.

It is known that CtB is a potent mucosal immunogen that induces strong urogenital antibody responses in humans (33, 34). Thus, to determine if vaccination with pCtB was able to induce mucosal antibody responses in mice and to investigate

if the presence of anti-CtB antibodies could affect the response against the coadministered antigen, mice were immunized with adjuvant pCtB, CtB, or CT alone or with each adjuvant together with plasmid p16L1. The titers of antibodies against L1 and CtB were evaluated. As shown in Table 1, IgA antibodies against CtB were detected in all vaccinated animals. Nevertheless, antibodies against L1 were observed only in animals immunized with p16L1 and an adjuvant. Interestingly, anti-L1 antibody titers remained high regardless of the presence of anti-CtB antibodies. This observation suggests that in our model intrinsic CtB immunogenicity does not alter the production of antibodies against the product of the coadministered plasmid DNA.

**Analysis of cell-mediated immune responses.** To assess the effect of pCtB on the generation of a cell-mediated immune response, we first evaluated the specific proliferation of lymphocytes derived from vaccinated mice. Spleen cells were isolated after intradermal vaccination. The lymphoproliferative responses after restimulation with HPV-16 VLPs are shown in Fig. 5. Vaccination with plasmid p16L1 or pL1tB induced a proliferative response significantly higher than that observed in

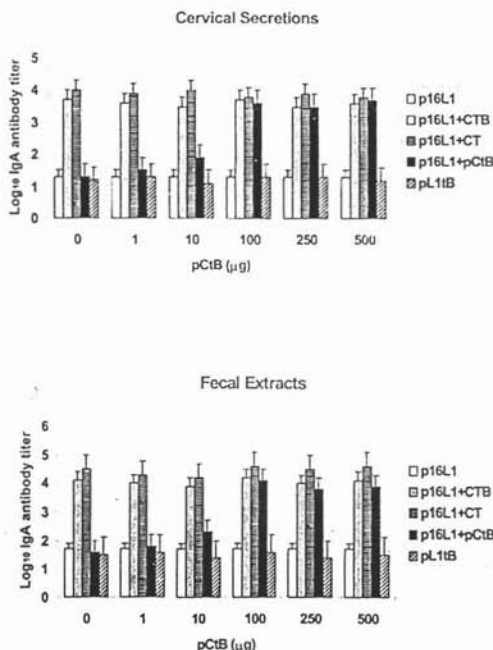


FIG. 4. Adjuvant effect of plasmid pCtB. Mice were vaccinated with 100  $\mu$ g of p16L1 in the presence and absence of the following adjuvants: commercial CTB polypeptide (p16L1 + CTB), commercial CT (p16L1 + CT), or different concentrations of plasmid pCtB (p16L1 + pCtB), as indicated. A group of mice received 100  $\mu$ g of plasmid pL1tB. All mice were given a booster immunization at day 14. IgA responses were measured in cervical secretions and fecal extracts collected at day 28. Bars represent the mean values for 10 mice assessed independently. Error bars indicate the standard errors of the means.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLE 1. Evaluation of induction of mucosal antibodies against CtB and L1 by plasmid vaccination

Inoculum	Log <sub>10</sub> titer ( <i>P</i> value <sup>a</sup> )	
	IgA anti-L1	IgA anti-CTB
<b>Cervical secretions</b>		
pCtB	0.5	1.9
pCtB + p16L1	3.2 (0.001)	1.8 (0.2)
CtB	0.4	2.6
CtB + p16L1	3.5 (0.0008)	2.4 (0.07)
CT	0.5	3.5
CT + p16L1	4.1 (0.0005)	3.1 (0.05)
<b>Fecal extracts</b>		
pCtB	0.3	2.1
pCtB + p16L1	3.5 (0.004)	1.8 (0.1)
CtB	0.2	3.8
CtB + p16L1	4.0 (0.0007)	3.4 (0.07)
CT	0.2	4.0
CT + p16L1	4.9 (0.001)	4.4 (0.07)

<sup>a</sup>*P* values were calculated by Student's *t* test to compare antibody titers induced by vaccination with the different adjuvants alone versus vaccination with the adjuvants plus plasmid p16L1.

pCtB-immunized mice ( $P < 0.01$ ). Lymphoproliferation was significantly increased by the presence of both commercial and plasmid adjuvants ( $P < 0.0001$ ). This observation indicates that CtB potentiates not only antibodies but also T-cell immune responses. We have previously demonstrated that DNA vaccination evokes a CD8<sup>+</sup>-T-cell response against cells expressing L1 (32). To examine the potential effect of the coadministration of pCtB on CTL activity, we evaluated the cytotoxicity of target cells expressing L1 by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes from immunized and control mice using a nonradioactive assay. Lysis of L1-expressing cells was not mediated by CD4<sup>+</sup> lymphocytes (Fig. 6). On the other hand, specific lysis of target cells by CD8<sup>+</sup> lymphocytes was not observed in mice immunized with PBS or pCtB alone (Fig. 6). A low level of CD8<sup>+</sup>

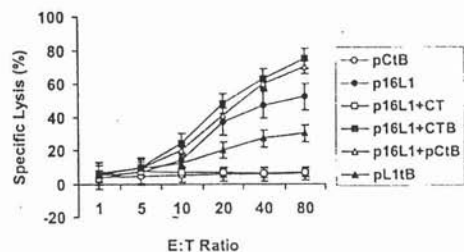
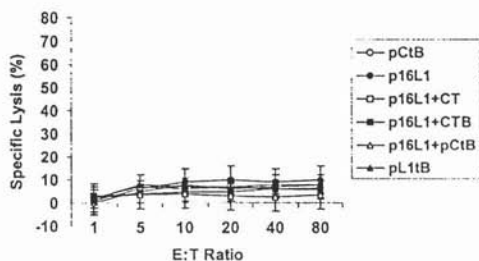
CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>

FIG. 6. Induction of CTL activity by the DNA vaccine with adjuvants. Spleen cells were obtained from mice vaccinated with p16L1, pL1tB, pCtB, or a combination of p16L1 with pCtB or commercial CTB and CT. Splenocytes were stimulated with HPV-16 L1 antigen for 5 days, CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> lymphocytes were depleted, and the remaining cells were tested for CTL activities. Specific lysis of HPV-16 L1-expressing B16F0 cells was evaluated at different effector cell/target cell (E:T) ratios, as indicated. Data represent the mean values for 10 mice per group assayed individually and are representative of two independent experiments. Error bars represent the standard errors of the means.

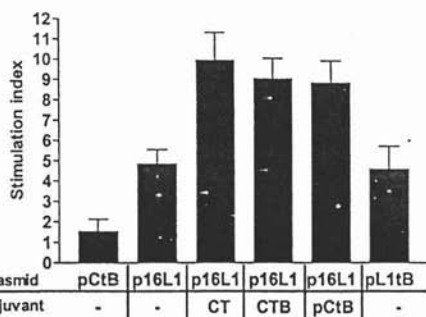


FIG. 5. Specific lymphoproliferative response induced by intradermal coadministration of p16L1 with adjuvants. Mice were given two intradermal immunizations with pCtB, pL1tB, or p16L1 alone or coadministered with either CT, CTB, or pCtB, as indicated. Spleen cells were collected 14 days after the second immunization. Proliferation was assessed after restimulation with HPV-16 VLPs. The results express the mean values for 10 mice per group and are representative of two independent experiments. Error bars indicate the standard errors of the means.

mediated CTL activity was observed in mice immunized with fusion plasmid pL1tB. As expected, CTL activity was induced by immunization with p16L1. Interestingly, a significant increase in the level of specific lysis was observed in mice that received p16L1 coadministered with either pCtB ( $P < 0.005$ ) or commercial CtB ( $P < 0.004$ ). Our results show that CTL activity is mediated by CD8<sup>+</sup> cells and that it is augmented by the presence of pCtB. We next investigated the type of Th response induced by the vaccine with an adjuvant. Vaccination with p16L1 or pL1tB caused moderate levels of secretion of IL-2 and IFN- $\gamma$  (Fig. 7), which seems to be in accordance with the modest CTL response observed. The levels of production of IL-2 and IFN- $\gamma$  were significantly increased in spleen cells from mice vaccinated with p16L1 and pCtB ( $P < 0.005$ ), CtB ( $P < 0.005$ ), or CT ( $P < 0.001$ ). In contrast, neither pCtB nor CtB induced the secretion of IL-4 (Fig. 7). These results suggest that DNA vaccination against L1 antigen induces a Th1-type response concomitant with CD8<sup>+</sup> CTL activity and that both responses are enhanced by coadministration of pCtB. Interestingly, coadministration of CT stimulated the produc-

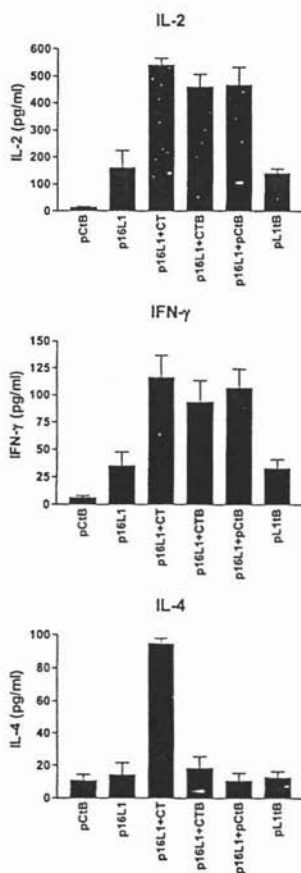


FIG. 7. Production of cytokines by spleen cells from vaccinated mice. Spleen cells were isolated from mice vaccinated with pCtB, pLtB, or p16L1 alone and in combination with pCtB or commercial CTB and CT. Cells were stimulated with HPV-16 L1 antigen for 48 h; and the production of IL-2, IFN- $\gamma$ , and IL-4 was evaluated in spleen cell cultures by quantitative ELISA. Error bars represent the standard errors of the means of duplicate experiments.

tion of IL-4, suggesting that the holotoxin is able to activate both Th1- and Th2-type responses.

## DISCUSSION

In the present work we have investigated the effect of the coadministration of the CtB-coding sequence on humoral and cellular immune responses after intradermal immunization with a DNA vaccine. The results indicate that the inclusion of pCtB enhances not only the humoral mucosal response but also the response mediated by Th1-type cells and CTLs.

Commercial CtB polypeptide or CT holotoxin was used as the positive control in all experiments. They induced significant increments in fecal and cervical IgA antibody titers compared

with the antibody titers in animals vaccinated with plasmid p16L1 alone. The capacity of CtB to induce high levels of serum IgG (4, 9, 10, 19, 38), fecal IgA (19, 20), and cervical IgA (14, 38) antibodies against different antigens has been demonstrated extensively. However, the effects of CtB and CT as adjuvants for a DNA vaccine have been less well documented. CT has been administered intranasally before DNA vaccination (21) and as an intramuscular booster (39) or an intranasal booster (44). Additionally, coadministration of CT has been demonstrated to increase the specific IgG (8) and mucosal IgA (24) responses mediated by DNA vaccines. However, most of those studies focused on the use of the whole CT. Here we demonstrated that the use of CtB subunit alone during both priming and booster intradermal immunizations strongly enhances the immune responses mediated by a DNA vaccine. In comparison with whole CT, which is a powerful toxin in humans, the CtB subunit is considered safe for administration to humans (17, 18); therefore, it may be a suitable adjuvant for DNA vaccines meant to activate human mucosal immunity.

DNA vaccines may afford a series of advantages over traditional vaccines, including greater stability. To be in consonance, the adjuvants used for DNA vaccines should offer equal advantages. Accordingly, the use of plasmids encoding molecules with demonstrated adjuvant capacities would be a suitable alternative to improve the efficacies of DNA vaccines without decreasing their advantages for commercial development. Previous work (32) indicated that application of an L1 gene-based DNA vaccine was able to induce genital IgA antibodies. Here we demonstrated that coadministration of a plasmid containing the CtB-coding sequence significantly increased specific IgA antibody titers in cervical secretions and fecal extracts. Earlier studies have established that DNA vaccine-mediated IgG responses can be enhanced by the use of plasmid vectors encoding the CT A and B subunits (2) or expressing the catalytic A subunit of CT (3). However, the adjuvant capacity of the CtB sequence alone for mucosal IgA responses has not been previously documented. The adjuvant effect of CtB for IgA antibodies observed herein might be associated with the capacity of CtB to stimulate isotype switching (27, 42). Interestingly, experimental evidence shows that induction of IgA switching by CtB depends on the presence of IL-2 as a cofactor (22). Accordingly, in this work we found that coadministration of pCtB prompted the production of IL-2 by antigen-stimulated spleen cells. Hence, we assume that enhancement of IL-2 production might be assisting IgA switching in our model. To corroborate this hypothesis the study of other factors involved in CtB-mediated IgA switching, such as transforming growth factor  $\beta$ 1 (22), is warranted.

Bacterial vector backbones usually contain CpG motifs, which are acknowledged to possess immunostimulatory properties (23). Interestingly, it has been documented that the addition of either CpG or CT produces a similar specific fecal IgA response (19). Thus, to address the question of whether the adjuvant effect observed in this work was due to the presence of CpG sequences rather than to the CtB gene, we constructed a translational fusion plasmid to drive the expression of the L1 protein fused to the N terminus of the CtB polypeptide. The fused genes were properly transcribed and translated, but the fusion protein was demonstrated to have lost its capacity to bind to GM<sub>1</sub> ganglioside. Concurrently with this, it

has been demonstrated that fusion of oligonucleotides to the N-terminal fragment of the CtB gene not only modifies the affinity of CtB for GM<sub>1</sub> ganglioside but also decreases the oral immunogenicity of the B subunit, suggesting a loss of biological activity (11). In accordance with this, we observed that coadministration of the fusion plasmid failed to induce an adjuvant effect, indicating that the enhancement of the immune reaction was not a consequence of the presence of bacterial CpG motifs.

Along with the IgA response, addition of pCtB had an adjuvant effect on specific lymphoproliferative responses, together with the production of IL-2 and IFN- $\gamma$  by stimulated T cells, but had no effect on the production of IL-4, which suggests the development of a Th1-type cellular response. Unlike pCtB and CtB, CT stimulated the production of IL-4. Our observations are in agreement with those from recent work in which coadministration of CtB onto skin favored the development of a vigorous Th1 cellular response (1), while the CT holotoxin was associated with the induction of a Th2-type response (13, 43). Nevertheless, more recent findings propose that Th1-Th2 polarization may depend not only on the adjuvant but also on the antigen coadministered (36). Consistent with this, administration of the HPV-16 L1 antigen, in the form of VLPs, prompts both Th1 and Th2 responses in mice (28), chimpanzees (29), and humans (31). In contrast, immunization of rhesus macaques with a plasmid DNA expressing the HPV-16 L1 antigen favors a strong Th1 response (41). The latter observation coincides with our finding that vaccination with plasmid p16L1 induces Th1 responses but seems to contradict the idea of the antigen as a regulator of the Th1-Th2 profile. Instead, our data appear to indicate that, at least in this case, the vaccine delivery system in combination with the adjuvant, rather than the antigen, balances the Th1-Th2 profile toward a Th1 response. This is an interesting observation, since it has been established that a Th1 cytokine pattern is strongly associated with the natural clearance of cervical HPV infections in women (37). Thus, we consider that the potential of p16L1 with pCtB as an adjuvant as a tool for the elimination of already established infections deserves further studies.

Cytotoxic cell-mediated immunity is likely to play a central role in eliminating HPV-infected cells, hindering disease progression. A previous study (32) provided evidence that DNA vaccination induces the generation of a cytotoxic response mediated by CD8<sup>+</sup> cells. Here we found that coadministration of pCtB enhances such a cytotoxic response. To our knowledge, there are no previous reports on the enhancing effect of the CtB gene on CD8<sup>+</sup>-cytotoxic-cell activity mediated by DNA vaccination. In an earlier work (2) an increase in CTL responses was reported to be mediated by coadministration of the A and B subunit-coding sequences together; however, the effect of the CtB gene alone was not tested. Inasmuch as IL-2 is known to stimulate activation of CD8<sup>+</sup> cells, the adjuvant effect of pCtB on CD8<sup>+</sup> CTL responses may be associated with the higher concentrations of IL-2 produced in mice immunized with the DNA vaccine and pCtB. However, we cannot underestimate the participation of other cytokines; hence, a better characterization of the stimulatory molecules produced as a response to the vaccine would be necessary to understand the mechanism involved in CTL activation.

The mechanisms by which plasmid DNA is expressed and

the gene product is presented to the immune system are not completely understood. It has been proposed that a small number of professional APCs are directly transfected with the injected DNA (30). Transfected APCs may traffic to regional lymphoid tissue, where they can activate B and T cells. Accordingly, it has been reported that plasmid DNA can be isolated from lymph node-derived and skin-derived dendritic cells after intradermal immunization (6). These observations lead us to assume that the adjuvant effect of pCtB might be mediated by the transfection of dermal APCs, which might have expressed the gene and transported the product to lymphoid tissue, where it might have interacted with its receptor on B and T cells, inducing the effects described. Further experiments are being conducted to determine the feasibility of the proposed mechanism.

In conclusion, our results indicate that the CtB-coding sequence can be used as an adjuvant to enhance immune responses to intradermally coadministered DNA vaccines. In particular, we have demonstrated that the adjuvant effect elicited by plasmid pCtB is comparable to that elicited by the CtB polypeptide. Therefore, pCtB is a good candidate as a genetic adjuvant of DNA vaccines meant to target the mucosal and cellular immune systems.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank John Schiller (National Institutes of Health) for the donation of recombinant baculovirus, Georgina Diaz Herrera for excellent technical assistance, and Isabel Perez Montfort for reviewing the English version of the manuscript.

This study was partially supported by DGAPA, National University of Mexico (grant IN225798).

#### REFERENCES

- Anjuere, F., A. George-Chandy, F. Audant, D. Rousseau, J. Holmgren, and C. Czerkinsky. 2003. Transcutaneous immunization with cholera toxin B subunit adjuvant suppresses IgE antibody responses via selective induction of Th1 immune responses. *J. Immunol.* 170:1586-1592.
- Arrington, J., R. P. Braun, L. Dong, D. H. Fuller, M. D. Macklin, S. W. Umlauf, S. J. Wagner, M. S. Wu, L. G. Payne, and J. R. Haynes. 2002. Plasmid vectors encoding cholera toxin or the heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* are strong adjuvants for DNA vaccines. *J. Virol.* 76:4536-4546.
- Bagley, K. C., M. T. Shata, D. Y. Onyiah, A. L. DeVico, T. R. Fouts, G. K. Lewis, and D. M. Hone. 2003. Immunogenicity of DNA vaccines that direct the coincident expression of the 120kDa glycoprotein of human immunodeficiency virus and the catalytic domain of cholera toxin. *Vaccine* 21:3335-3341.
- Bergquist, C., T. Lagergard, M. Lindblad, and J. Holmgren. 1995. Local and systemic antibody responses to dextran-cholera toxin B subunit conjugates. *Infect. Immun.* 63:2021-2025.
- Biet, F., L. Kremer, I. Wolowezuk, M. Delacere, and C. Lochet. 2003. Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing the cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.* 71:2933-2937.
- Casares, S., K. Inaba, T. D. Brumeanu, R. M. Steinman, and C. A. Bona. 1997. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med.* 186:1481-1486.
- Cuble, H. A., M. Plumstead, W. Zhang, O. de Jesus, L. A. Duncan, and M. A. Stanley. 1998. Presence of antibodies to human papillomavirus-like particles (VLPs) in 11-13-year-old schoolgirls. *J. Med. Virol.* 56:210-216.
- Cui, Z., and R. J. Mumper. 2003. The effect of co-administration of adjuvants with a nanoparticle-based genetic vaccine delivery system on the resulting immune responses. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55:11-18.
- Czerkinsky, C., M. W. Russell, N. Lycke, M. Lindblad, and J. Holmgren. 1989. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect. Immun.* 57:1072-1077.
- Dertzbaugh, M. T., and C. O. Elson. 1993. Comparative effectiveness of the cholera toxin B subunit and alkaline phosphatase as carriers for oral vaccines. *Infect. Immun.* 61:48-55.
- Dertzbaugh, M. T., and C. O. Elson. 1993. Reduction in oral immunogenicity



- of cholera toxin B subunit by N-terminal peptide addition. *Infect. Immun.* 61:384-390.
12. Elson, C. O. 1989. Cholera toxin and its subunits as potential oral adjuvants. *Immunol. Today* 14:29-33.
  13. Gagliardi, M. C., F. Sallusto, M. Marinaro, A. Langenkamp, A. Lanzavecchia, and M. T. De Magistris. 2000. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol.* 30:2394-2403.
  14. Haneberg, B., D. Kendall, H. M. Amerongen, F. M. Apter, J. P. Kraehenbuhl, and M. R. Neutra. 1994. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect. Immun.* 62:15-23.
  15. Holmgren, J., N. Lycke, and C. Czerniksky. 1993. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 11:1179-1184.
  16. Isaka, M., Y. Yasuda, M. Mizokami, S. Kozuka, T. Taniguchi, K. Mayano, J.-I. Maeyama, K. Mizuno, K. Morokuma, K. Ohkuma, N. Goto, and K. Tochikubo. 2001. Mucosal immunization against hepatitis B virus by intranasal co-administration of recombinant hepatitis surface antigen and recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* 19:1460-1466.
  17. Jertborn, M., A. M. Svennerholm, and J. Holmgren. 1992. Safety and immunogenicity of an oral recombinant cholera B subunit-whole cell vaccine in Swedish volunteers. *Vaccine* 10:130-132.
  18. Jertborn, M., I. Nordstrom, A. Kilander, C. Czerniksky, and J. Holmgren. 2001. Local and systemic immune responses to rectal administration of recombinant cholera toxin B subunit in humans. *Infect. Immun.* 69:4125-4128.
  19. Jiang, W., H. J. Baker, and B. F. Smith. 2003. Mucosal immunization with helicobacter. CpG DNA, and cholera toxin is protective. *Infect. Immun.* 71:40-46.
  20. John, M., E. A. Bridges, A. O. Miller, S. B. Calderwood, and E. T. Ryan. 2002. Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses after transcutaneous and oral immunization strategies. *Vaccine* 20:2720-2726.
  21. Kadowaki, S., Z. Chen, H. Asanuma, C. Aizawa, T. Kurata, and S. Tamura. 2000. Protection against influenza virus infection in mice immunized by administration of hemagglutinin-expressing DNAs with electroporation. *Vaccine* 18:2779-2788.
  22. Kim, P.-H., L. Eckmann, W. J. Lee, W. Han, and M. F. Kagnoff. 1998. Cholera toxin and cholera toxin B subunit induce IgA switching through the action of TGF- $\beta$ 1. *J. Immunol.* 160:1198-1203.
  23. Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, S. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, and D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature (London)* 374:546-549.
  24. Kuklin, N., M. Dalieshia, K. Kareem, E. Manickan, and B. T. Rouse. 1997. Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J. Virol.* 71:3138-3145.
  25. Lockman, H., and J. B. Kaper. 1983. Nucleotide sequence analysis of the A2 and B subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *J. Biol. Chem.* 258:13722-13726.
  26. Lycke, N., and J. Holmgren. 1986. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology* 59:301-308.
  27. Lycke, N., and W. Strober. 1989. Cholera toxin promotes B cell isotype differentiation. *J. Immunol.* 142:3781-3787.
  28. Marais, D., J. A. Passmore, J. Maclean, R. Rose, and A. L. Williamson. 1999. A recombinant human papillomavirus (HPV) type 16 L1-vaccinia virus murine challenge model demonstrates cell-mediated immunity against HPV virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 80:2471-2475.
  29. Palker, T. J., J. M. Monteiro, M. M. Martin, C. Kakareka, J. F. Smith, J. C. Cook, J. G. Joyce, and K. U. Jansen. 2001. Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. *Vaccine* 19:3733-3743.
  30. Pardoll, D. M., and A. M. Beckerleg. 1995. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunology* 3:165-169.
  31. Pinto, L. A., J. Edwards, P. E. Castle, C. D. Harro, D. R. Lowy, J. T. Schiller, D. Wallace, W. Kopp, J. W. Adelsberger, M. W. Baseler, J. A. Berzofsky, and A. Hildesheim. 2003. Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *J. Infect. Dis.* 188:327-328.
  32. Rocha-Zavaleta, L., J. E. Alejandre, and A. Garcia-Carranca. 2002. Parenteral and oral immunization with a plasmid DNA expressing the human papillomavirus 16-L1 gene induces systemic and mucosal antibodies and cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Med. Virol.* 66:86-95.
  33. Rudin, A., E. L. Johansson, C. Bergquist, and J. Holmgren. 1998. Differential kinetics and distribution of antibodies in serum and nasal and vaginal secretions after nasal and oral vaccination of humans. *Infect. Immun.* 66:3390-3396.
  34. Rudin, A., G. C. Riise, and J. Holmgren. 1999. Antibody responses in the lower respiratory tract and male urogenital tract in humans after nasal and oral vaccination with cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.* 67:2884-2890.
  35. Sack, D. A., S. Huda, P. K. Neogi, R. R. Daniel, and W. M. Spira. 1980. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for vibrio and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxin. *J. Clin. Microbiol.* 11:35-40.
  36. Sasaki, K., M. Kato, T. Takahashi, S. Ochi, Y. Ichinose, K. Shiraki, Y. Asano, M. Iwanaga, and T. Tsuji. 2003. Live varicella vaccine polarizes the mucosal adjuvant action of cholera toxin or its B subunit on specific Th1-type helper T cells with a single nasal coadministration in mice. *J. Med. Virol.* 70:329-335.
  37. Scott, M., D. P. Stites, and A.-B. Moscicki. 1999. Th1 cytokine patterns in cervical human papillomavirus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6:751-755.
  38. Shen, X., T. Lagergard, Y. Yang, M. Lindblad, M. Fredriksson, and J. Holmgren. 2000. Systemic and mucosal immune responses in mice after mucosal immunization with group B streptococcus type III capsular polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugated vaccine. *Infect. Immun.* 68:5749-5755.
  39. Stratford, R., G. Douce, F. Bowe, and G. Dougan. 2001. A vaccination strategy incorporating DNA priming and mucosal boosting using tetanus toxin fragment (TcTC). *Vaccine* 20:516-525.
  40. Svennerholm, A. M., J. Holmgren, R. Black, M. Levine, and M. Merson. 1983. Serologic differentiation between antitoxin responses to infection with *Vibrio cholerae* and enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 147:514-522.
  41. Tobery, T. W., J. F. Smith, N. Kuklin, D. Skulsky, C. Ackerson, L. Huang, L. Chen, J. C. Cook, W. L. McClements, and K. U. Jansen. 2003. Effect of vaccine delivery system on the induction of HPV-16L1-specific humoral and cell-mediated immune responses in immunized rhesus macaques. *Vaccine* 21:1539-1547.
  42. Whitmore, A. C., D. M. Prowse, G. Houghton, and L. W. Arnold. 1991. Ig isotype switching in B lymphocytes: the effect of T cell-derived interleukins, cytokines, cholera toxin, and antigen on isotype switch frequency of a cloned B cell lymphoma. *Int. Immunol.* 3:95-103.
  43. Xu-Amano, J., H. Kiyono, R. J. Jackson, H. F. Staats, K. Fujihashi, P. D. Burrows, C. O. Elson, S. Pillai, and J. R. McGhee. 1993. Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *J. Exp. Med.* 178:1309-1320.
  44. Yoshizawa, I., Y. Soda, T. Mizuochi, S. Yasuda, T. A. Rizvi, T. Mizuochi, T. Takemori, and Y. Tsunetsugu-Yokota. 2001. Enhancement of mucosal immune response against HIV-1 Gag by DNA immunization. *Vaccine* 19:2995-3003.