



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

PARTÍCULAS SEMEJANTES AL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16
OBTENIDAS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE JITOMATE GENERAN
ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN RATONES INMUNIZADOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
P R E S E N T A

YESSICA SARAI TAPIA GUERRERO

DIRECTOR DE TESIS: JORGE HERNÁNDEZ MONTES

ASESOR INTERNO: MA. DE LOURDES MORA GARCÍA



MÉXICO, D. F. JUNIO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna **TAPIA GUERRERO YESSICA SARAI**, con número de cuenta **302316434** de la carrera de Biología se le ha fijado el día **15** del mes de **JUNIO** de 2010 a las **12:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

VOCAL M. en C. JORGE HERNÁNDEZ MONTES

SECRETARIO DRA. MA. DE LOURDES MORA GARCÍA

SUPLENTE M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

SUPLENTE M. en C. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

El título de la tesis que presenta es: **Partículas semejantes al virus del papiloma humano tipo 16 obtenidas en plantas transgénicas de jitomate generan anticuerpos específicos en ratones inmunizados.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 13 de mayo de 2010.

C.D. ALFREDO S. SÁNCHEZ FIGUEROA
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCION

VO. BO.
BIÓL. GENARO MONTAÑO ARIAS
JEFE DE CARRERA

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

A los miembros del jurado:

Dr. Edelmiro Santiago Osorio

M. en C. Jorge Hernández Montes

Dra. Ma. De Lourdes Mora García

M. en C. Luis Sánchez Sánchez

M. en C. Luis Ledesma Martínez

Al Dr. Alberto Monroy García

A la Dra. Georgina Paz de la Rosa

Al CONACYT gracias al apoyo financiero del proyecto No. 82827
del cual fui becaria

Al COMECYT por la Beca Tesis de Licenciatura 2009

Les agradezco profundamente el apoyo y toda la ayuda brindada para la realización de éste trabajo; el tiempo, espacio, las observaciones, los consejos y la orientación.

DEDICATORIA

A Jehová dios por ser mi fortaleza en los buenos y malos tiempos, por permitirme observar cómo la naturaleza anuncia su perfecto diseño y poder. Porque de seguro el bien y la bondad amorosa mismos seguirán tras de mí todos los días de mi vida, mientras este contigo.

A mi apacito Víctor Tapia Palacios

Gracias mi queridísimo Eriilo, sin duda eres el mejor papá que pudiera tener, me diste la libertad de elegir un futuro a expensas de muchos sacrificios de tu persona, gracias por creer en mí y apoyarme, éste es el inicio de más bendiciones.

A Margarita Guerrero Martínez

Gracias mi amada Margaret, por sembrar en mí el deseo de progreso, por darme la oportunidad y todas las facilidades para concluir una educación superior. Además te dedicó esta tesis por todo el amor y bondad que has demostrado para conmigo, nadie ha alimentado con amor y buenas comidas mi alma más que tú, gracias por hacer nuestro hogar el mejor lugar para estar.

A Liliana Tapia Guerrero

Gracias mi amada patrocinadora oficial, este trabajo no puede ser dedicado a nadie más con honores que a ti, que estuviste muy inmiscuida en su realización ya sea recordándome que era mi deber terminarlo así como invitándome a tomar mis respiros, sin duda hermanita te agradezco por tener mucha fe en mí, sin ti no sería la mujer que soy, tus opiniones sobre mí son las más importantes en mi vida, te quiero mucho.

A Víctor Alejandro Tapia Guerrero

Debo de mencionarte que todos los ciclos tienen un principio y final, a veces podemos postergarlos pero jamás evitarlos, así que hermanito te invito a cerrar uno de todos los que has dejado abiertos, ya ves que hasta yo lo logre. Te agradezco formar parte de mi vida sin ti creo que tendría mucha bilis acumulada pero tú me ayudas a liberarla, te quiero mucho Cabeza.

A la Reina Duende

Te agradezco especialmente mi buena amiga Mariel por compartir tu carismática persona conmigo, por ser paciente, por esperarme muchas horas en los pocos años que llevamos en conocernos, por ayudarme con la realización de este trabajo, por escucharme, por compartir alegrías y tristezas, por tenerme un poco de fe y por aun mantenerte al pie del cañón en esta catastrófica amistad.

Al Biól. Chuy Rangel por hacer divertido y tenso el trabajo en el laboratorio, gracias por tu apoyo amigo durante la realización de éste.

A mis compañeros que estuvieron y están en el laboratorio de Inmunobiología, gracias por alegrar el ambiente con su amigable presencia: Azucena, Carmen, Karyna, Ivonne, Vianey, Paco, Selene, Arturo y Luis.

Ya que el hombre es el conjunto de sus relaciones sociales quisiera agradecer a todas mis amigas que me han venido escuchando y apoyado en algunos momentos difíciles de mi vida Danay, Veros, Liz, Fany y Chely.

A todos ustedes amigos míos, con los que compartí un periodo durante la carrera y que le pusieron el toque extra: A mi queridísima Chapis (Tania) por estar siempre lista para la diversión, a Juanito (Pollo), a mi súper brother Toño, a Jorge (por hacer que me regañaran las maestras), a Alex, Angel, a Manuel, Omar (Bambú), en fin a todos aquellos que el tiempo se encargo de reunirnos.

Porque no sólo no hubiera sido nada sin ustedes, sino con toda la gente que estuvo alrededor desde el comienzo, algunos siguen hasta hoy

GRACIAS TOTALES!!!!

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 Inmunidad Innata.....	3
1.2 Inmunidad Adaptativa.....	4
1.3 Inmunidad Humoral	5
1.3.1 Anticuerpos: Moléculas Efectoras De La Respuesta Humoral.....	7
1.3.2 Estructura Molecular De Los Anticuerpos	8
1.3.3 Función De Los Anticuerpos	10
1.4 Virus Del Papiloma Humano	13
1.4.1 Estructura Del Hpv	15
1.4.2 Capacidad Oncogénica De Las Proteínas E6 Y E7	16
1.5 Cáncer Cérvico Uterino	18
1.6 Respuesta Inmune Mediada Contra El Hpv.....	20
1.7 Partículas Tipo Virales (Vlp)	21
1.7.1 Expresión De Vlps En Plantas.....	23
1.8 Construcción De Genes de la proteína L1 del HPV-16.....	24
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVO GENERAL	27
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
MÉTODOS	28

5.1 Purificación de VLPs tipo silvestre (VLP) y VLPs tipo quiméricas (VLPq)	28
5.1.1 Separación de proteínas IgG por cromatografía de inmunoafinidad.....	28
5.1.2 Preparación De Columnas De Purificación	28
5.1.3 Extracción de VLPs de jitomate.....	29
5.1.4 Cuantificación de VLPj y VLPq.....	29
5.2 Inmunización de Ratones con las VLPj y VLPq	30
5.3 Determinación de Anticuerpos anti-VLP de HPV-16	31
5.4 Determinación de la especificidad de los anticuerpos producidos en ratones inmunizados con VLPj y VLPq	31
RESULTADOS.....	32
6.1 Purificación y cuantificación de VLPs	32
6.2 Respuesta humoral de VLPs jitomate	35
6.2.1 Anticuerpos IgG después de la segunda inmunización	35
6.2.2 Anticuerpos IgG después de la tercera inmunización.....	38
6.3 Actividad neutralizante de los anticuerpos	41
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIÓN.....	47
PERSPECTIVAS	47
BIBLIOGRAFÍA	48

RESUMEN

En la actualidad la población de los países subdesarrollados sufre los estragos provocados por enfermedades infecciosas, que en los países desarrollados ya no representan cifras significativas; estas grandes discrepancias no son más que el reflejo de diversos factores que envuelven a las condiciones de vida que hay en cada tipo de país, por ejemplo la situación actual de los países subdesarrollados está dada por la falta de acceso a un servicio médico de calidad que abarque a toda la población nacional, la falta de cultura sobre exámenes preventivos y también por falta de sufragio a las investigaciones para diseñar los propios medicamentos en dichos países, pues siempre se ha optado por comprar medicamentos al extranjero pese a los elevados costos que esto representa.

Entre las muchas infecciones que se presentan encontramos la del Virus del Papiloma Humano (HPV), que se presenta en un 85% de la población sexualmente activa, aunque la mayoría de los individuos puede eliminar la infección en los primeros meses; un pequeño número no logra hacerlo y como, posiblemente se hallen expuestos a subsecuentes infecciones, hace que estos individuos, generalmente mujeres, puedan desarrollar cáncer cérvico-uterino (CaCu) enfermedad que por ser asintomática, a nivel mundial por año se presenta con 400,000 nuevos casos de los cuales 200,000 culminan con la muerte.

A pesar de existir técnicas diagnosticas efectivas, relativamente baratas y accesibles, el CaCu sigue representando una importante causa de mortalidad, por lo que se plantea que prevenir sea más importante que diagnosticar oportunamente; principalmente prevenir la infección de las cepas más ligadas al CaCu.

Nuestro sistema inmune puede reconocer las proteínas virales que envuelven el material genético y si éstas no cambian de una generación viral a otra, el sistema inmune puede almacenar un "recuerdo" de ellas activándose más rápido y eficientemente en subsecuentes encuentros con el invasor viral. Con relación a lo anterior sabemos que el HPV es un virus desnudo con una cápside constituida a base de dos tipos de proteínas (L1 y L2), las cuales pueden expresarse en diversos sistemas tanto eucariontes como procariontes, de manera abundante y son capaces de autoensamblarse para formar partículas tipo virus (VLPs), son iguales a los viriones en forma y estructura pero no contienen material genético. En la actualidad se han empleado como vacunas, para generar anticuerpos listos para enfrentarse a una infección auténtica cuando esta ocurra, es decir se puede prevenir la infección por el HPV de los tipos de virus más frecuentemente relacionados con la carcinogénesis entre los que se hallan los tipos HPV- 16 y HPV-18.

Por otro lado hoy en día se busca no sólo prevenir sino también revertir las infecciones ya asentadas, lo anterior se puede lograr no sólo estimulando la respuesta mediada por anticuerpos sino, además aquella que está dada por células citotóxicas que pueden eliminar a las células infectadas del epitelio. Se tienen identificadas secuencias de las proteínas de expresión temprana

del HPV que se les ha identificado como oncogénicas (E6 y E7) y que son activadoras de células T citotóxicas.

En este trabajo se emplearon dos tipos de VLP, una construida a base de una versión mutada del gen de la proteína L1 del HPV-16, denominada VLP jitomate ó VLPj y otra con la misma base del gen de L1mut a la cual se le insertaron epitopos de los oncogenes de E6 y E7 en la parte carboxi-terminal, designada VLP quimérica o VLPq, de éstas dos versiones del gen: una busca activar al sistema humoral y VLPq además estimulará la respuesta citotóxica. Buscando hacer más accesible a la población las vacunas contra el HPV, se pretende disminuir el costo de las actuales vacunas, expresando las VLP en bioreactivos alternativos como son los vegetales, de los cuales la extracción y purificación de la proteínas resulta más viable, que de los actuales medios de expresión (células de insecto y levaduras).

El equipo de trabajo transfectó las construcciones de genes en plantas de jitomate para que las proteínas de L1-HPV-16 se expresen en los frutos. Las VLP expresadas de las plantas de jitomate transformado, se purificaron para comprobar su capacidad para activar al sistema inmune en un modelo murino, con ellas se realizaron tres inmunizaciones de 5µg de VLP de jitomate (VLPj) y de VLP quimérica (VLPq) en ratones de la cepa C57BL/6 , a los cuales se les extrajo el suero por medio de ELISA. Se detectaron anticuerpos conformacionales del tipo IgG específicos a VLP del HPV-16, con títulos similares para el grupo inmunizado con VLPj al grupo control inmunizado con VLPq, en el grupo VLPq también se observo un buen titulo sin embargo este es un ligeramente menor al del control. Además, de que se detecto la presencia de anticuerpos se observo su capacidad neutralizante, en un ensayo de inhibición de la hemaglutinación, los resultados obtenidos arrojan que la capacidad de los anticuerpos contra VLPq y VLPj, es similar a la actividad que presentaron los anticuerpos generados por la vacuna Gardasil®.

Estos datos demuestran que la expresión de VLP del HPV-16 en plantas representa una muy importante fuente alterna de material para generar en el país nuestra propia vacuna con menores costos de producción y la misma efectividad inmunológica que las actuales vacunas comerciales obtenidas en bacterias y baculovirus.

MARCO TEÓRICO

El mundo es un medio peligroso en el que el *Homo sapiens* debe de utilizar continuamente sofisticadas, flexibles y además letales defensas contra los regimientos masivos de virus, bacterias y parásitos eucariotas, que intentan introducirse en el cuerpo humano. La defensa del huésped es generar inmunidad contra estos organismos.

Desde el punto de vista histórico, inmunidad significa protección; biológicamente, se refiere a la protección frente a las enfermedades y más específicamente a las infecciosas. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen al sistema inmunológico, y la respuesta global coordinada para contrarrestar a la introducción de sustancias extrañas es la respuesta inmunitaria. El sistema inmunológico humano emplea distintos tipos de respuesta inmune que pueden dividirse para su estudio en forma general en dos categorías conocidas como respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa.

1.1 INMUNIDAD INNATA

La respuesta inmunológica innata es la primera línea de defensa cuando el organismo se encuentra con un nuevo patógeno, debe de impedir que éste penetre en las células y puede prevenir una infección o limitarla hasta que el sistema inmunológico pueda enviar más ayuda. Está constituida por barreras físicas y químicas, tales como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en las superficies; también hay células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos que son células que se unen a los microorganismos, los internalizan y después los matan), células citotóxicas conocidas como asesinas naturales, proteínas sanguíneas entre las que se incluyen a miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación, así mismo proteínas denominadas citocinas que regulan y coordinan muchas de las acciones de las células que intervienen los mecanismos de la inmunidad innata. Los elementos anteriormente descritos son estimulados por estructuras afines a grupos de microorganismos relacionados y pueden no distinguir diferencias sutiles entre las sustancias extrañas [Abbas *et al.*, 2007].

La inmunidad innata también se activa inicialmente por el daño ó la muerte celular que se manifiesta por la inflamación del tejido vascular local a la lesión, durante la cual se reclutan diversos factores efectores de la inmunidad innata tanto soluble como celulares, por ejemplo los fagocitos locales se activan y comienzan a secretar citocinas inflamatorias; además se activan las células dendríticas que por excelencia son presentadoras de antígeno (CPA) y que pueden activar a los linfocitos T vírgenes para poner en marcha la respuesta inmune adaptativa, que a su debido tiempo utilizará los mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar a los microorganismos. Las CPA ubicadas en los diferentes tejidos y las citocinas son el puente entre la inmunidad innata y adaptativa; éstas dicen a las células T qué tipo de defensa es necesaria y son fundamentales para la generación tanto de una eficaz y adecuada respuesta inmune, como para la regulación de la respuesta. En

conjunto, las respuestas inmunológicas están coordinadas para actuar frente a los patógenos y eliminarlos del organismo [Stanley *et al.*, 2005].

1.2 INMUNIDAD ADAPTATIVA

Al penetrar un material antigénico en un individuo sano induce en éste una respuesta inmunitaria, cuya acción más específica no es inmediata sino que requiere de algunos días para ponerse de manifiesto e incluye la producción de anticuerpos y de linfocitos sensibilizados o activados. Las células y los anticuerpos resultantes tienen la propiedad de reaccionar específicamente con el antígeno inductor de su producción; de ahí el término de inmunidad específica [Margni, 2000].

La respuesta inmune adaptativa es altamente específica para un patógeno particular; en contraste con la inmunidad innata, una mayor cantidad de mecanismos son estimulados por la exposición a los agentes infectantes e incrementa la capacidad defensiva cuando ocurre una exposición subsecuente a un microbio en particular. Porque esta forma de inmunidad desarrolla una respuesta a la infección y se adapta a la infección es llamada inmunidad adaptativa, la respuesta además mejora con cada encuentro sucesivo con el mismo patógeno: en efecto, el sistema inmune adaptativo recuerda al agente infeccioso y puede impedir que cause la enfermedad más adelante [Male *et al.*, 2004]. La respuesta inmunológica adaptativa está subdividida en dos ramas principales; inmunidad celular y humoral. Las respuestas inmunológicas celulares las realizan las células conocidas como células ayudantes T $CD4^+$, que son las que orquestan las actividades de otro grupo de células conocidas como linfocitos T citotóxicos (LTC), que pueden acabar con células infectadas por un virus particular. La respuesta humoral consiste en unas células denominadas células B que generan anticuerpos, que son moléculas proteicas con forma de "Y" que pueden adherirse específicamente a cualquier antígeno y así evitar que infecten a las células [Rojas-Espinosa, 2001].

Las células T son primordiales en el sistema inmune adaptativo, pues juegan un papel central en los dos tipos de inmunidades; la mediada por células y la inmunidad humoral (regulada por células B). Las células T reconocen antígenos procesados a péptidos cortos y presentados unidos a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC del inglés *major histocompatibility complex*) en la superficie celular, que junto con otros receptores y sus ligandos interactúan para dar como resultado la activación de las células T, es decir comienzan a proliferar y diferenciarse, esto debido a un incremento en la producción de interleucina 2 (IL-2) y su subsecuente unión a su receptor de alta afinidad [Osborne *et al.*, 2007].

Las células T activadas se dividen varias veces creando clonas de células progenitoras que se diferencian en poblaciones de células efectoras o de memoria. Las células T efectoras se dividen en dos tipos celulares los llamados linfocito T cooperadores o $CD4^+$ y los linfocitos T citotóxicos (LTC o $CD8^+$), estos últimos reconocen a las células infectadas por patógenos para el que son específicos o células tumorales, y las destruyen segregando una serie de moléculas (perforina, granzimas, FasL) que activan la apoptosis de la célula blanco [Osborne *et al.*, 2007].

Las células T $CD4^+$ por ejemplo tienen dos subpoblaciones conocidas como células Th2 y Th1, de las cuales las Th2 secretan interleucina 4 e interleucina 10 (IL-4 e IL-10) entre otras

citocinas que ayudan a los linfocitos B primarios a diferenciarse a células plasmáticas secretoras de anticuerpos, las moléculas efectoras de la respuesta humoral. Por otra parte tenemos a la subpoblación Th₁ que secreta interferon gamma (IFN- γ) que activa a los macrófagos, células asesinas naturales y linfocitos T citotóxicos [Stanley, 2005].

Una tercera categoría de las células T son las células T reguladoras con el fenotipo CD4⁺ CD25⁺, expresa el receptor Foxp3 factor de transcripción y normalmente segregan factor de crecimiento transformante (TGF- β) e IL-10, generalmente estas células se encargan de reconocer antígenos propios para así prevenir la autoinmunidad, sin embargo se les ha descrito como reguladoras de la repuesta inmune contra antígenos exógenos por lo que han sido relacionadas con infecciones inmunopatológicas crónico virales [Rouse y Souvas, 2004].

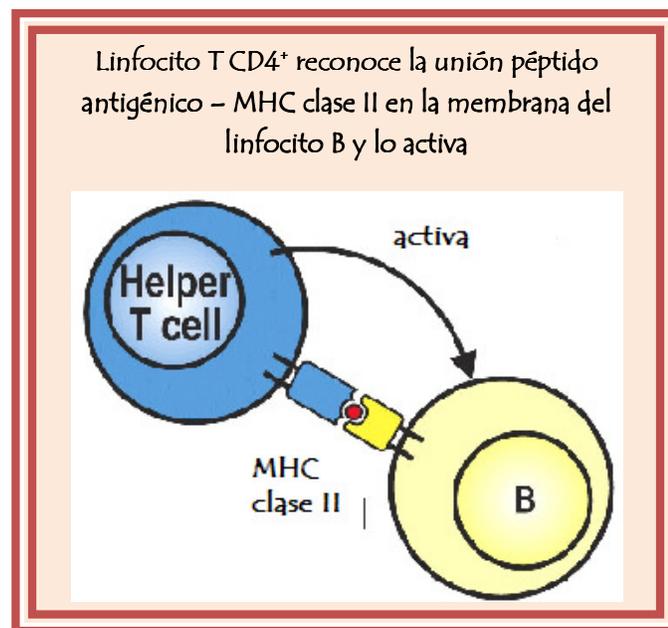


Figura 1. Linfocito T CD4⁺ ó cooperador reconoce la presencia del complejo MHC-antígeno en la membrana del linfocito B y se une a ella, al hacerlo secreta citocinas que llevarán al linfocito B a activarse: diferenciación y proliferación como células productoras de anticuerpos [tomada de Janeway *et al.*, 2001].

1.3 INMUNIDAD HUMORAL

La inmunidad humoral es mediada por moléculas en la sangre llamadas anticuerpos o inmunoglobulinas, que son producidos por los linfocitos B y células plasmáticas en los órganos linfoides y la médula ósea, pero realizan su función efectora en lugares distantes de su lugar de origen. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y sus toxinas, gracias a que los anticuerpos secretados pueden unirse a los microorganismos consiguiendo su eliminación. Aún los microbios intracelulares obligados como los virus, son blanco de los anticuerpos antes de infectar a las células, o cuando estos son liberados en forma de viriones desde las células infectadas. La inmunidad humoral frente a toxinas microbianas se descubrió a principios de 1900 como una

forma de inmunidad que podía transferirse de individuos inmunizados a individuos no estimulados o vírgenes mediante el suero, sobre esta base se desarrollaron vacunas que actúan incrementando el número de anticuerpos específicos [Abbas *et al.*, 2007].

Los linfocitos B provienen de un progenitor común que se halla en la médula ósea y su maduración requiere de una serie de fases que culminan con una célula funcional. En la primera fase del desarrollo, las células B progenitoras en la medula ósea sufren un rearrreglo de los genes de sus receptores de membrana. Esta fase es independiente de antígeno pero es dependiente de las interacciones con las células estromales de la médula ósea (fig. 2 primer panel), la célula B inmadura que lleva un receptor de antígeno de superficie celular llamado inmunoglobulina M (IgM), puede ahora interactuar con los antígenos en su entorno. Aquellas células B inmaduras, que son fuertemente estimuladas por el antígeno en esta fase mueren o se inactivan, en un proceso denominado selección negativa, en el cual se eliminan del repertorio muchas células B que son autorreactivas (fig. 2 segundo panel).

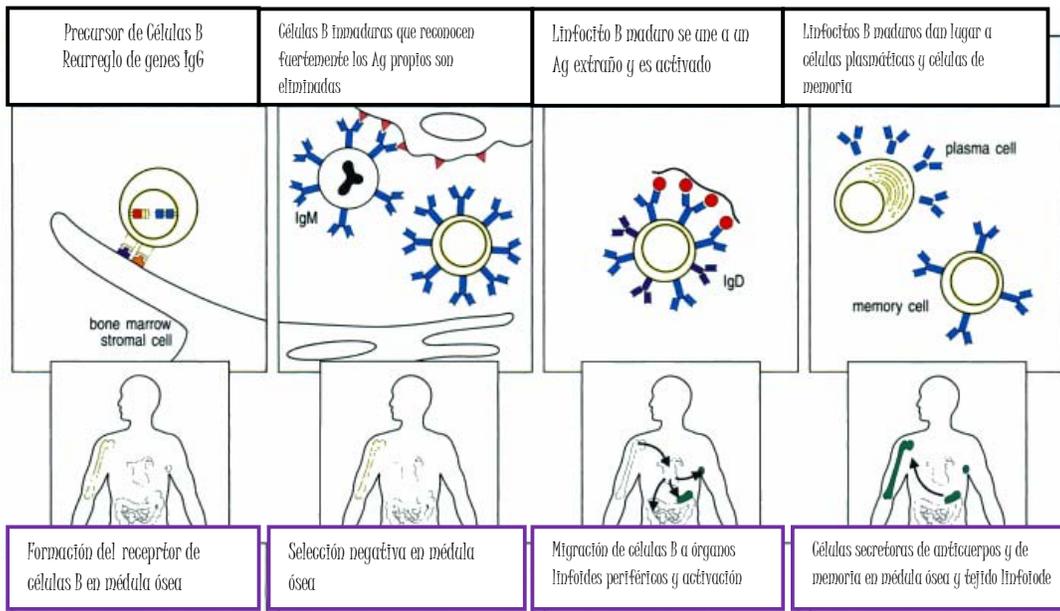


Figura 2. Desarrollo de células B en la médula ósea y la migración hacia a órganos linfoides periféricos, donde los linfocitos maduros pueden ser activados por antígenos (Ag) extraños [tomado de Janeway *et al.*, 2001].

En la tercera fase de desarrollo, las células B inmaduras sobrevivientes emergen a la periferia y maduran para expresar el ya mencionado receptor IgM así como el receptor IgD. Ahora pueden ser activadas por el encuentro con su antígeno específico o extraño en un órgano linfóide secundario. Cada célula B madura tiene en su membrana envolvente, el receptor de células B; una inmunoglobulina o una molécula de anticuerpo que es específico para un motivo discreto o Epítopo de un antígeno (fig. 2 tercer panel) [Kenneth *et al.*, 2008]. Una vez que las células B vírgenes encuentran antígenos y se activan, se compromete estrictamente a una proliferación y a un programa de diferenciación donde se generan las

células B específicas de la memoria y células plasmáticas efectoras del antígeno que la activo. Las células plasmáticas secretan grandes cantidades de anticuerpos, que son solubles pero por lo demás, versiones idénticas del receptor en la membrana envolvente de células B (fig. 2 cuarto panel) [Stanley, 2005].

1.3.1 ANTICUERPOS: MOLÉCULAS EFECTORAS DE LA RESPUESTA HUMORAL

Los anticuerpos son receptores de las células B pero secretados, la diferencia entre uno y otro es la pequeña porción del carbono terminal; en el caso del receptor de la célula B, el C-terminal es hidrófobo, mientras que en el caso del anticuerpo es hidrófilo, lo que permite a los anticuerpos ser secretados. Los anticuerpos tienen una forma aproximada a una "Y" (véase figura 3), los dos brazos de la Y en la última región varían entre moléculas de anticuerpos, por eso se le llama región variable (V) y tiene participación en la unión con el antígeno fragmento de unión al antígeno o región Fab, considerando que el tallo de la Y ó región constante (C) es muy poco variable y ésta se ve envuelta en la interacción con células efectoras y moléculas, recibe el nombre de fragmento cristalizante o Fc [Male *et al.*, 2001].

Los anticuerpos ó inmunoglobulinas son moléculas glicoproteínas altamente específicas, poseen sitios que son sumamente variables de una molécula a otra, lo que constituye la base para el reconocimiento de la inmunidad, se unen específicamente a uno o varios antígenos estrechamente relacionados, cada inmunoglobulina se une en realidad a un determinante antigénico específico [Mayer, 2009]. Las moléculas de anticuerpos presentan características similares básicas pero presentan una notable variabilidad en las regiones de unión al antígeno, se estima que existen aproximadamente 10^9 moléculas de anticuerpos diferentes en cada individuo, cada una con secuencias de aminoácidos únicas en sus sitios de unión al antígeno. Las funciones efectoras y las propiedades fisicoquímicas comunes de los anticuerpos se asocian a los segmentos que no se unen al antígeno, mismas que presentan una escasa variación entre los distintos anticuerpos [Abbas *et al.*, 2003].

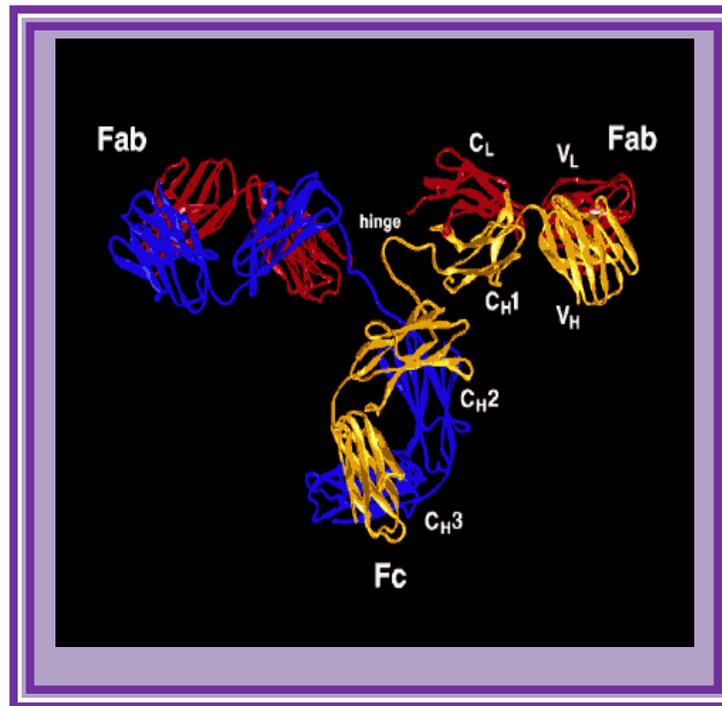


Figura 3. Diagrama de cinta de la estructura de un anticuerpo IgG, basado en una imagen de cristalografía de rayos X, Fab: fracción del anticuerpo que se une con el antígeno, Fc fracción cristalizante o constante [Tomado de Janeway *et al.*, 2001].

1.3.2 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS ANTICUERPOS

Todos los anticuerpos poseen una estructura básica simétrica compuesta de dos cadenas ligeras idénticas; cada una con aproximadamente 24 kilodaltons (kD) y dos cadenas pesadas idénticas que pesan entre unos 55 y 70 kD, sin embargo dentro de esta categoría general existen cinco diferentes clases de inmunoglobulina (Ig), presentes en todos los mamíferos superiores, ellas son diferentes en tamaño, carga, la composición de aminoácidos y contenido de carbohidratos en la región constante [Abbas *et al.*, 2007].

Las moléculas de los anticuerpos están conformadas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas, las cadenas pesadas se unen la una a la otra por puentes disulfuro y a su vez cada una de ellas se une a una cadena ligera también por puentes disulfuro, formando dos sitios idénticos de unión al antígeno en la región Fab o fragmento de unión al antígeno. Los sitios de unión al antígeno están formados por la yuxtaposición de los dominios variables de la cadena ligera (V_L) y de la cadena pesada (V_H) de la inmunoglobulina lo que le da a un anticuerpo la habilidad de poderse unir simultáneamente a dos estructuras idénticas. Además los anticuerpos poseen una región bisagra que es una secuencia de aminoácidos sin homología con otros dominios, rica en prolina que confiere flexibilidad y que hace que los dos brazos Fab puedan rotar independientemente uno respecto del otro, formando ángulos variados respecto a la fracción constante del anticuerpo Fc o fracción cristalizante (véase fig. 4) [Abbas *et al.*, 2007].

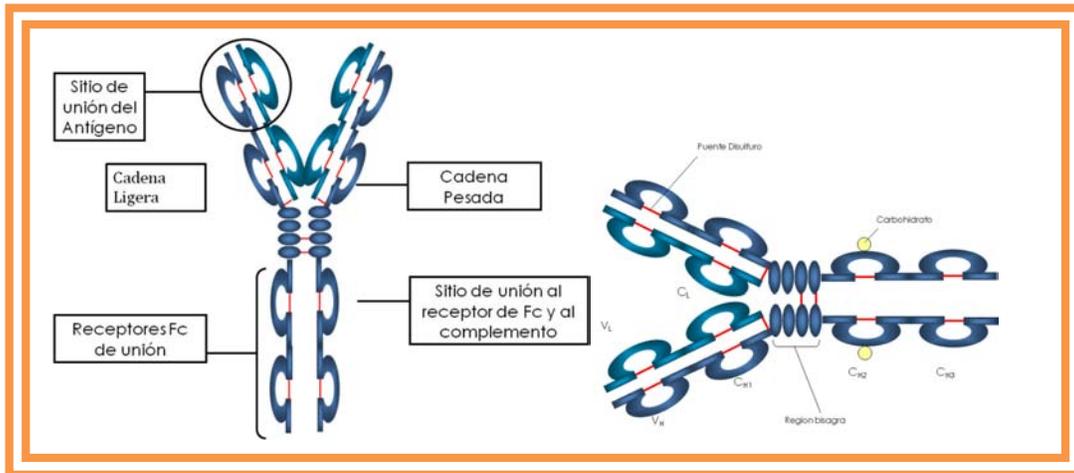


Figura 4. Estructura de una inmunoglobulina: región Fab constituida por un fragmento de la cadena variable ligera V_L y cadena pesada variable V_H , la región Fc se compone por el resto de las cadenas C_L fragmento de la cadena constante ligera, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} son los fragmentos de la cadena pesada constantes [Tomada y modificada de Mayer, 2009].

Existen dos tipos de cadenas ligeras, lambda (λ) y kappa (κ), pero solo algún tipo de cadena ligera (V_L), se unirá covalentemente a la cadena pesada (V_H). No se han encontrado diferencias funcionales entre anticuerpos que posean la cadena ligera λ ó la κ , y cada tipo de cadena se puede encontrar en cualquiera de las cinco clases. La clase y la función efectora están determinadas por la estructura de la cadena pesada. Existen cinco clases principales de cadena pesada o isotipos, algunos con varios subtipos, difieren en sus propiedades biológicas, localizaciones funcionales y capacidad para reconocer diferentes tipos de antígenos. Las cinco clases de inmunoglobulinas son inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) y la inmunoglobulina E (IgE). Sus cadenas pesadas están denominadas por las letra minúscula griega (μ , γ , δ , α y ϵ respectivamente). La IgG es el isotipo mas abundante en el plasma sanguíneo, con varias subclases (IgG₁, -2, -3, y -4 en humanos) [Kenneth *et al.*, 2008].

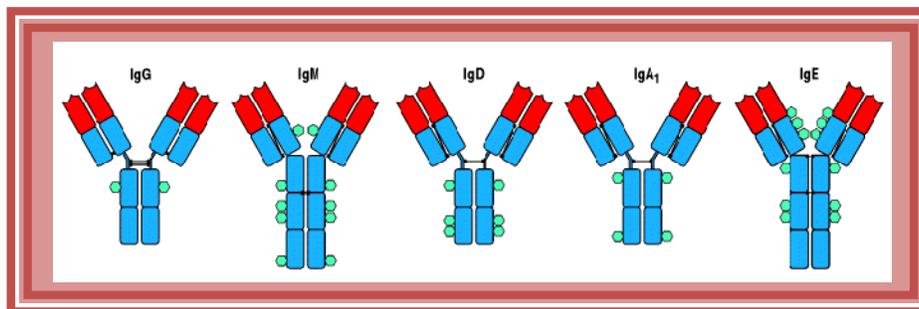


Figura 5. Las cinco diferentes clases o isotipos de inmunoglobulinas [tomado de Rosen y Geha, 2004].

1.3.3 FUNCIÓN DE LOS ANTICUERPOS

Una vez que son producidos, los anticuerpos entran a circulación en el torrente sanguíneo hasta localizar al antígeno en superficies expuestas del epitelio, donde inhiben la entrada o ingesta de microbios. La primera exposición a un antígeno por infección o vacunación conduce a la activación de linfocitos B vírgenes y su diferenciación en células productoras de anticuerpos y células de memoria. Una exposición a una subsecuente infección conduce a la activación de linfocitos B de memoria y a una más grande y más rápida respuesta de anticuerpos, con una alta afinidad por el antígeno destino, es éste proceso que se explota en la vacunación profiláctica [Stanley, 2005]. Se denomina seroconversión cuando son detectables anticuerpos específicos en el suero de la sangre como resultado de una infección o una inmunización. Defectos en la producción de anticuerpos resulta en un incremento de la susceptibilidad a contraer infecciones por muchos microbios. La más efectiva vacunación induce una protección primaria por la estimulación de producción de anticuerpos [Abbas *et al.*, 2004].

Las células B liberadas tempranamente frente a una respuesta inmune tienden a tener una vida corta; en contraste, las derivadas de los centros germinales migran a la médula ósea y persisten en este sitio donde continúan con la producción de anticuerpos por años después de la eliminación del antígeno. Frecuentemente la inmunoglobulina G (IgG) es encontrada en sueros de individuos normales, como producto de células plasmáticas que la producen a lo largo de la vida. Las funciones de los anticuerpos son mediadas por las regiones constantes de la cadena pesada, y los isotipos de las cadenas pesadas sirven para distintas funciones efectoras; como es el caso de las IgG que opsonizan a los antígenos para la fagocitosis que es llevada a cabo por macrófagos y neutrófilos, activa la vía clásica del complemento, y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, mediada por células asesinas naturales [Abbas *et al.*, 2007].

Los anticuerpos tienen como función principal unirse al antígeno dando como resultado la protección del hospedero. Cuando ocurre la unión antígeno-anticuerpo las sustancias extrañas son destruidas, pues las inmunoglobulinas actúan como transductores de la información en la presencia de los antígenos que serán destruidos según el método más idóneo para ello, en el que pueden participar macrófagos, polimorfonucleares, células asesinas naturales y proteínas del complemento por medio de mecanismos que pueden ser diferentes según el tipo de inmunoglobulina que participa [Rojas-Espinosa, 2001].

Los anticuerpos pueden participar en la defensa del huésped por tres maneras: neutralización, opsonización y activación del complemento; cuando los anticuerpos forman uniones con las toxinas bacterianas, previniendo que éstas interactúen con las células huésped y que causen una patología, se denomina neutralización [Rosen y Geha, 2005]. Muchos tipos de células humanas necesitan replicarse o realizar copias de sí mismas. Cuando un virus penetra por primera vez en el organismo, infecta las células y toma el control de los procesos que la célula emplea normalmente para replicarse y en su lugar, crea más copias del virus. Estos virus pueden infectar a continuación más células, estableciendo un círculo vicioso de infección. Un virus y una célula son como dos piezas de un rompecabezas que encajan entre sí,

pero cuando un anticuerpo se une al virus, se interpone entre ambas, impidiendo que se conecten y la infección surja [VAX, 2007].

Igualmente, una toxina libre puede reaccionar con receptores de la célula huésped, considerando que el complejo antígeno-anticuerpo no ocurra. Los anticuerpos también neutralizan completamente partículas virales y bacterias celulares uniéndose a ellas e inactivándolas. El complejo antígeno-anticuerpo es eventualmente evacuado y posteriormente degradado por los macrófagos. Cuando un antígeno está recubierto por anticuerpos como agente extraño es reconocido por los fagocitos (macrófagos y leucocitos polimorfonucleares) los cuales lo ingieren y destruyen, en la llamada opsonización. Las células bacterianas cubiertas por anticuerpos pueden quedar expuestas a la activación del sistema de complemento por la unión de la primera proteína del sistema del complemento al complejo antígeno-anticuerpo, la primera proteína del sistema del complemento C1q (vía de activación clásica), Los anticuerpos y el complemento pueden limitar la extensión viral o la reinfección, mandando a los patógenos blanco y sus productos a la eliminación por los fagocitos ó por la lisis medida por los componentes del de ataque a la membrana [Rosen y Geha, 2005].

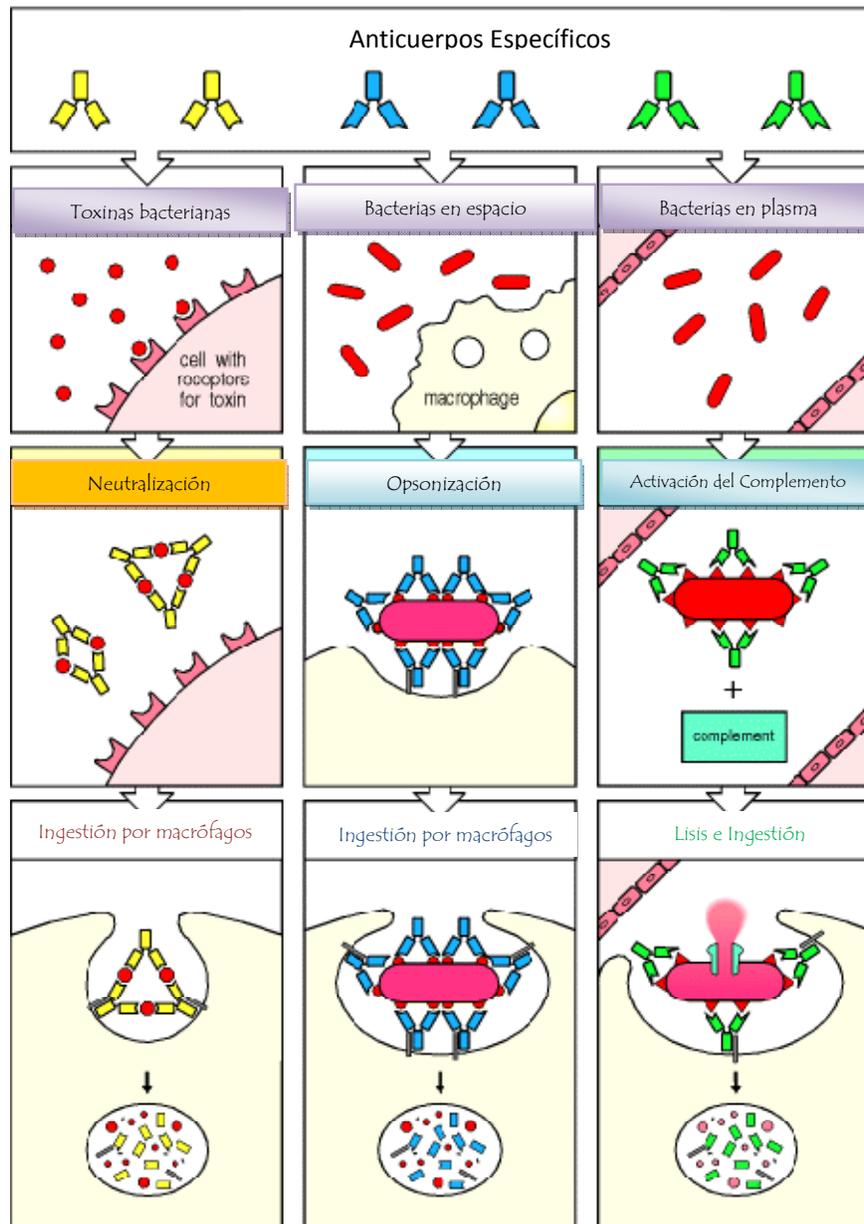


Figura 6 Los anticuerpos (Ac) pueden participar en la defensa del huésped de tres formas. La columna izquierda muestra a un Ac que se une a una toxina bacteriana, previniendo que interactúe con una célula huésped. La toxina libre puede reaccionar con los receptores de la célula huésped, mientras que el complejo toxina: Ac no puede. En la columna central se muestra cuando los Ac de recubrimiento de un antígeno lo hacen reconocible como extranjero por los fagocitos, que ingieren y luego lo destruyen, opsonización. La columna derecha muestra la activación del sistema del complemento por Ac que cubren la superficie de una célula bacteriana. Ac unidos forman un receptor para la primera proteína del sistema del complemento, que finalmente forma un complejo de proteínas en la superficie de la bacteria. [tomada de Rosen y Geha, 2004].

1.4 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

En el año de 1907 Ciuffo realizó la primera demostración acerca del carácter viral de las verrugas cutáneas humanas. Walesh observó en 1917 que al inocular un extracto de condiloma a individuos voluntarios, la enfermedad se producía entre los seis y los ocho meses; Sera en 1923 demostró que el condiloma tenía un origen viral al utilizar inóculos de material filtrado. Por otra parte en 1933 Shope aisló el primer virus de papiloma en conejos infectados con virus del papiloma de conejo común (PVCC), el virus causaba papilomas cutáneos en el huésped natural y experimentaba alteración maligna en un 25 % de los casos. [De Palo *et al.*, 2007; Herrera y Restrepo, 2007]. En 1949, Strauss y colaboradores aislaron el agente responsable de las verrugas, el virus del papiloma humano y desde este tiempo ha sido ampliamente reconocido como un patógeno humano [Brentjens *et al.*, 2002]. La transmisión sexual de las verrugas cutáneas fue confirmada por Barret y colaboradores en 1954, Dunn y Ogilvie establecieron la etiología viral de las verrugas genitales en el año de 1968 y para 1970 Oriol y Almeida empleando microscopia electrónica identificaron en las verrugas genitales partículas virales similares a las presentes en verrugas cutáneas [De Palo *et al.*, 2007]. En los últimos dos decenios transcurridos, se descubrió el DNA del virus del papiloma humano en los cánceres de cuello uterino por Zur Hausen en 1983, hallazgo que le hizo ganador del Premio Nobel de Medicina en el año 2008 y además ahora el virus del papiloma humano se ha caracterizado como agente causal de cáncer cérvico-uterino [Yugawa y Kiyono, 2009].

El virus del papiloma humano (HPV por sus siglas en inglés), pertenece a la familia *Papillomaviridae*, del acrónimo Papova (PApiloma, POlioma y VAcuilizante) donde se incluía también otros tipos de virus como el virus del polioma y el virus vacuolante del simio. Infecta el epitelio escamoso pues son exclusivamente epiteliotrópos y específicos de cada huésped, además son resistentes a solventes orgánicos y al calor (56°C), no son cultivables y se les puede localizar por lo menos en treinta lugares de los genitales y produce un rango de neoplasias epiteliales, tanto benignas como malignas [De Palo *et al.*, 2007].

Los virus del papiloma humano se encuentran en un grupo heterogéneo cuyos diversos genotipos son capaces al igual que en los animales de producir lesiones proliferativas en la piel y las mucosas (tumor de Shope en los conejos y cáncer de esófago en los bovinos), el patrón de crecimiento depende no solamente del genoma viral, sino también de las condiciones del tejido infectado [Alonso *et al.*, 2000]. Actualmente han sido descritos 118 tipos de virus de papiloma humano y muchos nuevos subtipos se detectan mediante ampliación subgenómica. Todos los tipos de virus de papiloma que se conocen actualmente, se clasifican según su asociación con lesiones invasivas y malignas en virus de papiloma humano de alto riesgo (HPV-AR), y virus de papiloma humano de bajo riesgo (HPV-BR) a aquellos que no están asociados con lesiones cancerígenas (véase tabla 1) [Xu *et al.*, 2006].

Tipos de Papilomavirus Humano	
Alto Riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Probable Alto Riesgo	26, 53, 66, 68, 73, 82
Bajo Riesgo	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108

Tabla 1. Clasificación de los tipos de papilomavirus con relación a su capacidad para provocar carcinogénesis, la clasificación probable alto riesgo engloba a los tipo de virus que desarrollan posibilidad de carcinogénesis limitadas al ser humano pero que son insuficientes en animales de experimentación [Muñoz *et al.*, 2003].

De los 118 tipos descritos, aproximadamente 40 son afines a infectar epitelios y mucosas. En los seres humanos constituyen uno de los grupos virales que más frecuentemente infectan en las cavidades conjuntivas, en la cavidad oral, en laringe, el árbol traqueo-bronquial, el esófago, la vejiga, el ano y el tracto genital, tanto en hombres como en mujeres. El virus está asociado con el 90% de los casos de verrugas genitales, y algunos tipos virales se han relacionado con la aparición de varios cánceres, especialmente del carcinoma epidermoide del cuello del útero, además de en el ano, la vulva y el pene. Posteriormente se han publicado datos que revelan que el 20% de los cánceres de orofaringe se deben al HPV [Muñoz *et al.*, 2003]. En recientes investigaciones se reveló la presencia de DNA de HPV infectante en células anormales del tejido ductal de muestras de cáncer de mama, con lo que también se relaciona al HPV con el cáncer de mama [Lawson *et al.*, 2009].

El HPV es altamente infectivo con un índice de transmisión mayor al 50% después de la exposición, de hecho la infección genital con virus del papiloma humano es una de las enfermedades más comunes de transmisión sexual, estudios revelan que más del 80% de mujeres y hombres sexualmente activos se han expuesto por lo menos a un tipo de HPV y sujetos al desarrollo de alguna patología asociada a éste [Koutsky, 1997; Moscicki, 2005], al ser una infección de transmisión sexual, el uso de condón masculino puede ser eficaz para evitar la infección, pero no lo suficientemente efectivo, ya que puede reducir sólo en cierta medida el riesgo de las enfermedades por infección de HPV [Family Health International, 2001]. Las mujeres que adquieren la infección de un 70 a 90% la eliminan dentro de los dos primeros años, sin embargo un pequeño número fallan al eliminar el HPV y corren el riesgo de desarrollar cáncer cérvico-uterino, ya que es conocido que persistentes infecciones con HPV de alto riesgo (HPV-AR) es un prerrequisito para el desarrollo de esta enfermedad [Kjaer *et al.*, 2002]. Con relación a esto se ha observado que las mujeres inmuno-comprometidas tienden a fallar en eliminar la infección por HPV incrementando el riesgo de desarrollar cáncer cérvico-uterino [Visser *et al.*, 2007].

Una fracción considerable de infección por HPV es sub-clínica tanto en mujeres como en hombres; no obstante; el hombre puede participar sólo como portador y vehículo de la infección durante el contacto sexual. Las parejas de mujeres con infección viral pueden no presentar lesiones la mayoría de las veces, pero la prueba de ácido acético descubre lesiones no visibles en la mitad o hasta en las dos terceras partes de estos individuos, también se ha

demonstrado que el 50% de las lesiones penéneas histológicamente muestran cambios como acantosis y papilomatosis, además de que las parejas de mujeres con lesiones de alto grado también en un 20% pueden tener lesiones penéneas de alto grado [Alonso *et al.*, 2000].

1.4.1 ESTRUCTURA DEL HPV

Cómo se mencionó anteriormente el HPV es un virus desnudo o simple de DNA de doble cadena circular, con un diámetro de 55 nm de conformación icosaédrica de las proteínas de la cubierta viral o cápside, conformada por 72 unidades y una superficie sin envoltura. El genoma consta de aproximadamente 8000 pares de bases, con un peso molecular de 5.2 kD, el DNA de doble cadena viral tiene ocho genes, de los cuales seis son de expresión temprana por tanto son llamados tempranos ó *Early* (E) que codifican para proteínas que participan en la replicación, regulación y modificación del funcionamiento vírico y celular; y dos genes de expresión tardía ó *Late* (L) que codifican para las proteínas estructurales que forman la cápside vírica [De Palo *et al.*, 2007]. Las proteínas E5, E6 y E7 están involucradas en la transformación maligna, E1 y E2 en la replicación del genoma viral; E2 también regula la expresión de los genes tempranos y en especial reprime la expresión de los oncogenes E6 y E7. Los genes de expresión tardía: L1 y L2 codifican para las proteínas de la cápside (véase tabla 1). Además de estos genes, el genoma viral tiene una región de 800 pares de bases (pb) conocida como región larga reguladora (del inglés *Long Control Region* LCR), la cual contiene muchos elementos de regulación de la transcripción y el origen de replicación del virus [Cid- Arregui, 2009].

Tabla 2. Función de las proteínas virales del HPV [Tomado de Cid- Arregui, 2009].

Gene	Función
E1	Codifica a una helicasa para la replicación episomal del DNA viral
E2	Regula la expresión temprana de los genes E6 y E7, facilitando la replicación del virus
E4	Permite el ensamblaje viral y altera el citoesqueleto para facilitar la liberación del virus
E5	Altera el pH endosomal y el reciclamiento de receptores de (EGF) a la superficie celular
E6	Inactiva la función de p53 e inhibe la apoptosis
E7	Se une a pRB y reactiva la síntesis de DNA del huésped
L1	Constituye el 80% de la cápside (cubierta) viral
L2	Constituye el 20% de la cápside viral

Los genes de E5, E7, E1 y E2 son expresados en células basales indiferenciadas y suprabasales, la transcripción de otros genes tempranos como son: E1, E4 y los genes virales de la cápside, L1 y L2, están restringidos a las capas diferenciadas de la periferia en el epitelio, así como la amplificación del DNA del HPV [Galloway, 2009].

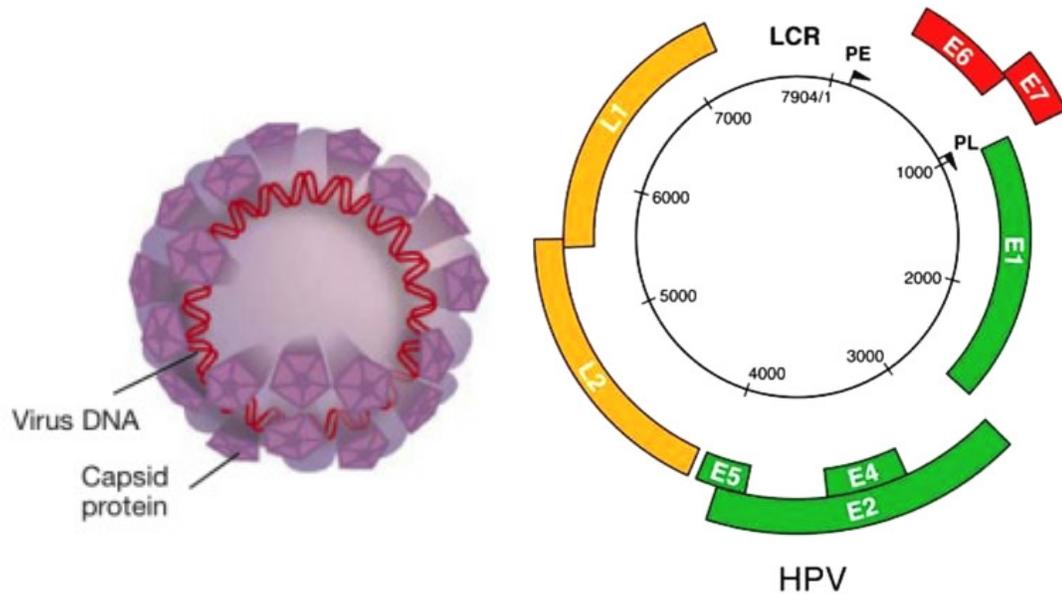


Figura 7. Estructura de los viriones de HPV. Del lado izquierdo se presenta el esquema de un virion de HPV donde se muestra su genoma viral de doble cadena y las proteínas de la cápside. Por el lado izquierdo se presenta la secuencia de los genes que conforman el HPV los de expresión temprana (E 1 a 7) y los de expresión tardía (L1 y L2), la región larga de control (LCR) [Tomada de Cid-Arregui, 2009].

1.4.2 CAPACIDAD ONCOGÉNICA DE LAS PROTEÍNAS E6 Y E7

Cuando los virus infectantes son del tipo 6 y 11, y la infección es productiva, el DNA viral se halla libre en el núcleo en forma de episomas circulares, en estas condiciones las manifestaciones de que hay una infección se manifiestan morfológicamente por la presencia de coilocitosis: células escamosas maduras superficiales ó intermedias con un halo perinuclear bien definido, el citoplasma residual es denso y hialino, y la maduración del epitelio por queratinización (disqueratocitos) y finalmente muerte en las células infectadas. En cambio cuando la infección es por los subtipos 16 y 18, no hay manifestación morfológica, ya que partes del genoma viral de E6 y E7 se integran al DNA del huésped en donde tienen una actividad transformadora. Se ha evidenciado que las células que están infectadas con los tipos 16 y 18 presentan alteraciones en el número y características de los cromosomas como son: aneuploidias y atipias nucleares, característica de lesiones de displasia intensa y lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado [Alonso *et al.*, 2000].

Los oncogenes E6 y E7 juegan un papel primordial en la transformación y mantenimiento del fenotipo maligno [Visser *et al.*, 2007]. Además, estas proteínas son importantes por sus propiedades en la carcinogénesis ya que tienen la capacidad de inmortalizar y transformar a las células, y mantienen el ambiente celular para que el genoma viral pueda subsistir mientras no se encuentre incorporado en los cromosomas [Molina *et al.*, 2005]. Las proteínas E6 y E7 del HPV son expresadas en lesiones pre-malignas y lesiones cervicales avanzadas, interactuando con las proteínas p53 y proteína del retinoblastoma (pRB), que son bien conocidas como supresores de tumores celulares implicados en procesos como la progresión del ciclo celular, la reparación del DNA, la apoptosis, la diferenciación, la senescencia, y la remodelación de la cromatina. Resulta importante mencionar que en la gran mayoría de los tumores humanos pRb y/o funciones de p53 se hallan reducidas [Buitrago-Pérez *et al.*, 2009].

Múltiples estudios moleculares han informado que la carcinogénesis mediada por el HPV se debe principalmente a la actividad oncogénica de las proteínas tempranas virales E6 y E7. Por ejemplo E6 es capaz de inducir la degradación de la proteína p53 a través de la unión directa a la ubiquitina ligasa E6AP y contribuir a la génesis de los tumores. La proteína p53 detecta si la célula funciona correctamente o no; prácticamente cualquier alteración que pueda sufrir una célula es comunicada por distintas vías moleculares a p53, quien integra la información y finalmente, podría decirse que elige si la célula en cuestión puede seguir funcionando ó por el contrario, es demasiado anormal y debe ser auto-eliminada, su actividad constante de vigilancia para que no haya células anormales o cancerosas en nuestro cuerpo es de vital importancia. Esta "función suicida" evita que las células anormales o disfuncionales permanezcan en nuestros tejidos, con el evidente riesgo que esto entraña. De hecho, la pérdida accidental por mutación de p53 es responsable de casi el 50% de los cánceres humanos, incluido entre ellos el CaCu, en el resto de los cánceres p53 suele tener una funcionalidad reducida. La proteína E6 también ejerce otros efectos: interviene en la degradación de BAX un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 y activa la telomerasa [Llanos *et al.*, 2009].

Por otra parte, la proteína E7 se une a la proteína pRB y desplaza a los factores de transcripción E2F que normalmente inactivan a la proteína pRB, cuya actividad es importante para la regulación del ciclo celular; además, E7 induce la degradación mediada por el proteasoma de todos los pRb (pRb, p107 y p130). También inactiva a los CDKI CDKN1A/p21 y p27. La proteína E7 de los tipos de HPV de alto riesgo (16, 18 y 31) se une a las ciclinas E y A, a las que posiblemente activa [Llanos *et al.*, 2009]. La infección por virus del papiloma de alto riesgo produce efectos similares a la falta de genes supresores del cáncer, puesto que activa las ciclinas e inhibe la apoptosis y combate el envejecimiento celular. Por tanto, las proteínas del HPV crean muchas de las condiciones esenciales para la aparición del cáncer; sin embargo, experimentalmente ha sido demostrado que por sí misma la infección por HPV no es suficiente para producir el cáncer, pues la transformación maligna se completa sólo cuando se hace una transfección del DNA vírico con un gen RAS mutado, lo que indica que con toda probabilidad el HPV actúa junto con otros factores ambientales [De Palo *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2005].

1.5 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

El cáncer es el estado final de un proceso de múltiples pasos. Experimentalmente, se han identificado tres procesos que llevan a la neoplasia: inicio, promoción y progresión. El inicio incluye la alteración del DNA, las células iniciales tienen una histología normal, pero se vuelven susceptibles a una transformación maligna. La promoción se define como la alteración de la expresión de la información genética y finalmente la progresión es la evolución clonal de tumores establecidos. [Stites *et al.*, 2004]. El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es una alteración celular que se origina en el epitelio del cuello del útero y que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, que se pueden suceder en etapas de displasia leve, moderada y severa. Evolucionan a cáncer in situ (circunscrito a la superficie epitelial) y/o a cáncer invasor, en donde ya se traspasa la membrana basal [Superintendencia de salud, 2009].

El CaCu en México, en el año 2007 ocupó la onceava posición dentro de las veinte causas de mortalidad de la población total femenina con 4,046, en el 2008 representa la segunda causa de muerte en el sector de la población que cuenta con 25 años y más; también es necesario destacar que su ocurrencia sigue afectando más a las mujeres que viven en condiciones de desventaja social y económica, por lo que su reducción es una prioridad para el sistema de salud del país [Garrido *et al.*, 2009], cabe mencionar que si se detecta tempranamente es curable en un 95% de los casos [Universia, 2008]. En el Programa Sectorial de Salud se estableció la meta para el año 2012 de disminuir 27 por ciento la tasa de mortalidad por cáncer cérvico-uterino en mujeres de 25 años o más, lo que significa que, utilizando como punto de partida la tasa registrada en 2006, para el año 2012 no debieran ocurrir más de 11 defunciones por cien mil mujeres en este grupo de edad. Al respecto, en el 2008 la mortalidad por CaCu fue de 14 defunciones por cien mil mujeres de la población objetivo [Garrido *et al.*, 2009].

Los factores que con frecuencia están ligados al cáncer cérvico-uterino son: el inicio temprano de actividad sexual, embarazos en la adolescencia, más de tres partos a lo largo de la vida, dos o más parejas sexuales, el estrés, una mala alimentación, los cambios hormonales que trae consigo la menopausia y el rechazo por un falso pudor a la prueba del Papanicolaou, que consiste en un raspado de tejido para obtener una muestra y analizar las células del cérvix. Además el Virus del papiloma Humano (HPV) es reconocido universalmente como el agente etiológico para desarrollar cáncer cervical, pues el DNA de HPV se ha detectado en el 99.7% de todos los cánceres de cérvix [Walboomers *et al.*, 1999]. A lo largo de la historia el perfil epidemiológico de las mujeres con cáncer cervical ha sido reconocido como parte de un proceso de transmisión sexual al cual se asocian varios microorganismos como *Chlamydia trachomatis*, el virus del herpes simple 2, el *Treponema pallidum* y la *Neisseria gonorrhoeae* sin establecerse una clara asociación de causa - efecto [Smith *et al.*, 2004].

En el año de 1956 Koss y Durfee encontraron cambios celulares en las citologías a los que denominaron coilocitos. Meissels fue quién encontró la asociación entre coilocitos y HPV, posteriormente Zur Hausen en los años 80's sugirió la asociación directa entre HPV y cáncer cervical. De manera que el carcinoma cervical surge como resultado de una infección

persistente no controlada con tipos de HPV de alto riesgo, en particular, de los tipos HPV-16 y HPV-18. Las lesiones de bajo grado ocurren de manera general en mujeres jóvenes y puede ocurrir regresión, sin embargo; las lesiones de alto grado representan persistencia viral e integración del DNA de HPV por tanto requieren de tratamiento [Bian *et al.*, 2008].

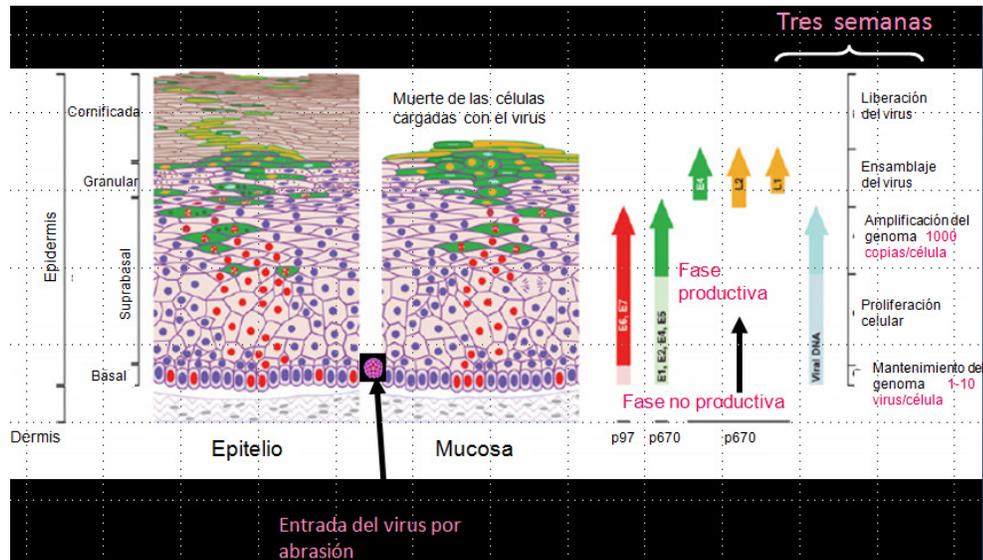


Figura 8. El ciclo de replicación del HPV, comienza cuando el virus ingresa a las células del estrato germinativo a través de una microlesión o solución de continuidad tisular. Es entonces cuando comienza la expresión de E1. Conforme las células se van diferenciando se reduce la expresión de E7 e inicia la replicación del DNA viral y empiezan a expresarse E4, E2 y E5 en la capa intermedia del epitelio cervical. Conforme van migrando a la superficie del epitelio las partículas virales son ensambladas. Finalmente los viriones se liberan al eliminarse por descamación los queratinocitos muertos [Middleton *et al.*, 2003].

El aspecto clínico de la infección se inicia cuando el virus penetra en el epitelio del cuello del útero o de la vagina, que al ser epitelios en constante crecimiento y maduración, resultan ser ideales para la infección y desarrollo del virus. La infección se realiza a través de microabrasiones, de ahí que el virus pueda penetrar hasta la zona basal. Puede manifestarse inmediatamente o permitir un estado de latencia: fase no productiva, se lleva a cabo en las células basales y el virus se mantiene como un plásmido nuclear, puede durar semanas o hasta meses, está mediado por varios factores, tanto del virus como del huésped, y una vez que termine ese periodo comenzará la fase productiva que transcurre en el compartimiento suprabasal conforme las células se van diferenciando, los eventos que la caracterizan son: amplificación del ADN, expresión de los genes L1 y L2 y producción de viriones (figura 8) [Genther *et al.*, 2003]. Esta se presentará bajo tres modalidades: infección clínica: produce síntomas y puede verse a simple vista en forma de verrugas o lesiones condilomatosas, infección subclínica: se hace evidente utilizando solamente algún procedimiento como el colposcopio o el microscopio, infección latente: sólo se va a identificar por medio de investigaciones virológicas, pues no hay presencia de cambios macro ni microscópicos en el epitelio infectado [Alonso *et al.*, 2000].

1.6 RESPUESTA INMUNE MEDIADA CONTRA EL HPV

El HPV desarrolla varios mecanismos para evadir la respuesta inmune innata y así demorar la activación de la respuesta inmune adaptativa. A pesar de su capacidad para obstaculizar los mecanismos de defensa, casi en todos los casos se establece una respuesta inmunitaria satisfactoria a la infección genital por HPV. Sin embargo, el saneamiento viral puede ser retrasado considerablemente debido a que el ciclo del virus no provoca la muerte de los queratinocitos, particularmente la infección por tipos de HPV de alto riesgo (HPV-AR), lo que da como resultado la ausencia de señales proinflamatorias. De manera que, el tiempo necesario para la supresión de los HPV-AR, particularmente HPV-16, se lleva entre 8 a 14 meses en promedio, que es considerablemente más largo que de los 5 a 6 meses que son necesarios para la eliminación de los tipos de bajo riesgo [Franco *et al.*, 1999].

Las únicas fuentes de antígeno totalmente accesibles en la primera etapa de la lesión intraepitelial escamosa, son partículas virales libres, integradas por 360 copias de la proteína L1 que forman la cápside y que son liberados de la capa apical de los queratinocitos que son positivos a la proteína L1 de la cápside, en la infección por HPV, durante la fase de producción al final del ciclo natural del virus. Para que un virus genere una efectiva respuesta inmune específica, las partículas de éste deben ser detectadas por los vehículos blindados de epitelio escamoso, como las células de Langerhans y células dendríticas, que pueden ser promovidas por microlesiones en la zona de transformación del epitelio. La CPA activadas luego emigran a los ganglios linfáticos de drenaje, y presentan los antígenos a las células T vírgenes que se hallan en el tejido linfático. Las células T se deben diferenciar en células efectoras "armadas" (linfocito T citotóxico), que regresaran al sitio de la infección, para destruir los queratinocitos infectados, llevando a una remisión espontánea de la lesión. Además, se ha demostrado que la evaluación inmunoquímica de la proteína L1 del HPV en los estadios tempranos de la infección es útil para predecir el resultado de las lesiones displásicas [Griesser *et al.*, 2009].

En un estudio realizado con 187 casos de displasia temprana con infección por HPV⁺, la persistencia o la progresión de la displasia se observó en el 94,8% de los casos negativos para L1, este resultado hace hincapié en la importancia de la proteína L1 de la cápside del HPV como estímulo importante para la activación del sistema inmune y en la regresión de la displasia. El rápido avance de las displasias leves y moderadas a lesiones de neoplasia intraepitelial cervical grado 3 (NIC 3) dentro de 6 meses parece apoyar la idea de que la progresión de la enfermedad puede estar vinculada a un fracaso del sistema inmune local. La infección por HPV no productiva de L1, se considera como un evento precanceroso, puesto que a la larga puede conducir a trastornos de interacción virus-célula, dando lugar a perturbaciones de la regulación del ciclo celular en los niveles de la transcripción, traducción y la genómica [Griesser *et al.*, 2009].

1.7 PARTICULAS TIPO VIRALES (VLPs)

Desde el siglo XX los inmunólogos y biólogos, han trabajado en la posibilidad de tratar a los aquejados de cáncer mediante estrategias inmunitarias; este interés surgió a raíz de que las terapias contra el cáncer incluyen fármacos que por un lado destruyen las células en división o bien las bloquean, pero que no sólo tienen el efecto en las células alteradas sino que también se afecta a células normales que se encuentran en proliferación; de manera que ahora se pretende generar una respuesta inmune específica que pueda evitar que factores externos transformen a las células, y si la célula ya está transformada se logre reconocer y destruir a los clones antes de que se formen los tumores o destruir tumores que ya estén establecidos.

En el caso del cáncer cérvico-uterino donde el principal factor de riesgo es la presencia de algún tipo de HPV de alto riesgo (HPV-AR), lo que se busca es que la población femenil con vida sexual activa genere defensas contra estos tipos de virus y así se evite la infección. Esto se ha logrado gracias a las propiedades de las proteínas de la cápside, L1 y L2, que expresadas en sistemas eucariontes o procariontes, pueden autoensamblarse y formar partículas tipo virales ó VLPs (del inglés *virus-like particles*), ya sea que se exprese sola la proteína L1 o junto con la proteína L2. Estas VLPs se han utilizado para estudios de respuesta inmune para HPV-AR, y aunque se probó su eficacia profiláctica siguen careciendo de potencial terapéutico [Zur Hausen *et al.*, 1981; Frazer, 2004].

El virión de papilomavirus consta de 72 pentámeros de la proteína L1, con la proteína L2 presente en proporción 1/30 con respecto a la L1, y un diámetro de aproximadamente 50 a 60 nm. Los VLP carecen del genoma viral y sus características morfológicas son muy similares al virión del papilomavirus, lo que les confiere la habilidad para ser blancos de anticuerpos monoclonales dependientes de conformación y tipo específicos. Muchos estudios han demostrado que la vacunación con los VLP por diferentes métodos puede inducir altos títulos de anticuerpos específicos de neutralización (IgG e IgA) lo que confiere una efectiva protección en animales y humanos frente a una infección con el virus de papiloma [Fife *et al.*, 2004]. En el mercado existen dos vacunas a base de VLP: una bivalente (HPV-16 y -18) y una cuadrivalente (HPV-6, -11, -16 y -18) producidas por Glaxo/Smith/Kline y Merck respectivamente, que han resultado muy efectivas en la protección de la mujer contra la incidencia y persistencia de la infección por el HPV [Olsson *et al.*, 2007]. Sin embargo estas implican algunas desventajas entre ellas: se deben aplicar a edades tempranas, sólo cubren al sector de la población que no ha tenido aun contacto con el virus, cubren a quien tenga la posición económica para adquirir las tres dosis, ya que tienen altos costos y la falta de políticas de salud para costearla donde es más necesaria, debido a que los resultados reales se perciben a muy largo plazo, décadas [Agosti y Goldie, 2007].

Debido a su seguridad y a su alta inmunogenicidad las VLPs son las candidatas idóneas para vacunas del tipo profiláctico y también actualmente se trabaja para conferirles el potencial terapéutico contra la infección por HPV [Harper *et al.*, 2004].

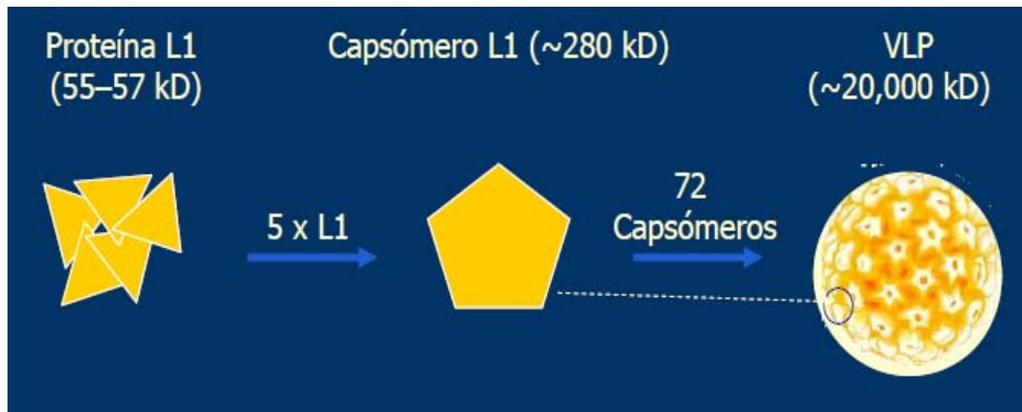


Figura 9. Una partícula tipo viral (VLP) de HPV, está conformada por 72 capsómeros o pentámeros formados por cinco unidades de la proteína L1, estructuralmente son idénticas a un virión sólo que las VLP carecen de DNA [tomado de Kirnbauer et al., 1992].

Las VLPs de papilomavirus son por sí mismas buenas activadoras de la respuesta inmune ó adyuvante, y pueden inducir una fuerte respuesta de células T cooperadoras. Además, al carbono terminal de la proteína L1 del PV se le pueden ensamblar muchos tipos de polipéptidos cortos de aproximadamente 60 aminoácidos para los cuales también se obtiene buena respuesta inmunológica, características que hacen que las VLPs sean buenos candidatos para funcionar como vehículos para la liberación de epítopes o de genes [Muller y Gissman, 1997; Paintsil, 1996]. Desde que se detectó que las partículas tipo virales (VLP) son viables para activar ampliamente la vía de señalización de MHC I en ausencia de infección o replicación intraepitelial, las VLPs son buenas candidatas para formar vacunas terapéuticas que induzcan una eficiente respuesta inmunológica en ausencia de la replicación viral [Ruedl et al., 2001].

1.7.1 EXPRESIÓN DE VLPs EN PLANTAS

En la década de los 90's surgió la inquietud de emplear plantas como biofábricas de proteínas recombinantes, una aplicación muy interesante es la producción de proteínas con función farmacológica, así se han expresado diferentes proteínas, de patógenos, humanos y animales, también algunos biomateriales (cómo colágeno y fibroína: proteína de la tela de las arañas), proteínas inmunológicas (quimiocinas, interleucinas e incluso inmunoglobulinas completas y funcionales). Las ventajas que presenta el sistema vegetal sobre los demás sistemas de expresión son: entre otras, los bajos costos de producción, el bajo riesgo de contaminación del material con patógenos humanos, las modificaciones postraduccionales semejantes a células animales y un almacenamiento conveniente de la proteína de interés [Gómez, 2007]. El sistema vegetal representa menores costos y mantenimiento para el crecimiento de plantas comparados con los sistemas recombinantes de producción usando cultivo de células animales, fermentadores microbianos o animales transgénicos [Joshi y Lopez, 2005]. Se estima que el costo por producción de 1g de proteína de células CHO de mamífero en alrededor de \$300 mientras que la misma cantidad de proteína tiene un costo de

\$0.10 obtenida por ingeniería vegetal [Hood *et al.*, 2002]. Los sistemas de expresión en plantas transgénica ofrecen el potencial de estabilidad en largos periodos a temperatura ambiente, lo cual reduce grandemente los costos de almacenamiento y distribución que representan los tradicionales inyectables y los vehículos alternativos de administración oral, como los microbios recombinantes atenuados [Joshi y Lopez, 2005].

Se requiere que los antígenos expresados en plantas tengan características que favorezcan su reconocimiento por el sistema inmune mamífero, para tal efecto, a veces se fusionan al antígeno una proteína acarreadora de mayor tamaño o de características inmunogénicas ya probadas [Rigano *et al.*, 2004]. La capacidad de la proteína estructural L1 de los papilomavirus de ensamblarse en VLP, es una característica explotable para usarla como proteína acarreadora de antígenos [Xu *et al.*, 2006].

Actualmente se han desarrollado numerosas estrategias para la inserción de genes foráneos en el genoma de plantas. Las técnicas actuales de transformación de plantas nos permite obtener la proteína recombinante en algún tejido en particular, incluso dirigirlas a un compartimiento subcelular para promover su acumulación. También se puede dirigir la expresión a un estado fisiológico específico de la planta para proveer su expresión y/o acumulación de la proteína recombinante, mediante el uso de diferentes promotores [Gomez, 2007]. En cuanto a la elección de destinos subcelulares para la expresión de los transgenes, se puede realizar mediante la fusión de secuencias de envío a organelos como retículo endoplásmico, mediante el uso de secuencias SEKDEL o KDEL [Streatfield, 2007].

El uso de partículas tipo virus como vacuna en contra de la infección del HPV es la terapia profiláctica más prometedora hasta el momento [Rambout *et al.*, 2007]. Por ello existe gran interés en la expresión del gen estructural L1 en diferentes sistemas de expresión, incluyendo plantas. Se ha reportado la expresión de la proteína estructural L1 del HPV-16 en plantas de tabaco [Liu *et al.*, 2005, Varsani *et al.*, 2003, Maclean *et al.*, 2007], Arabidopsis [Kohl *et al.*, 2007] y papa [Biemelt *et al.*, 2003]. También se ha expresado el gen estructural L1 del HPV-11 [Warzecha *et al.*, 2003, Kohl *et al.*, 2007] y papilomavirus que afectan animales, como a perros [Azhakanandam *et al.*, 2007] y a conejos [Kohl *et al.*, 2007].

Sorpresivamente se ha obtenido una expresión más eficiente en el modelo vegetal de versiones del gen estructural L1 con uso de codones para humanos comparado con otros tipos de codones [Biemelt *et al.*, 2003, Maclean *et al.*, 2007]. Otra estrategia ha sido eliminar las secuencias inhibitoras de la expresión de L1 en algunos tipos celulares, que se encuentran en la región codificante del extremo 5', estas secuencias permiten restringir la expresión de L1 a queratinocitos diferenciados terminalmente [Tan *et al.*, 1995, Sokolowski *et al.*, 1998]. Las secuencias y mecanismos exactos de inhibición no se conocen del todo, sin embargo se ha encontrado que mutando los primeros 514 nucleótidos de la secuencia original de L1, sin alterar la secuencia de aminoácidos, se incrementa significativamente la expresión de L1 en células epiteliales humanas transfectadas, la inactivación de los elementos negativos a través de mutaciones puntuales resulta en un 31% de nucleótidos mutados, además, se determinó que la inhibición no se afecta a nivel traduccional, ya que la presencia de codones raros, no reduce los niveles de proteína producida [Collier *et al.*, 2002].

Por otro lado, dada la alta expresión de los genes tempranos en infecciones activas, las vacunas terapéuticas contra el HPV deberían utilizar proteínas tempranas como antígenos. Las proteínas E6 y E7, que como se dijo antes, son muy importantes para la inducción y mantenimiento de la oncogénesis y son coexpresadas en la mayoría de los carcinomas cervicales, representan blancos muy importantes para el desarrollo de una inmunoterapia [Franconi *et al.*, 2002; Wilson y Rosas-Acosta, 2003]. Se ha demostrado que estas proteínas contienen varios epítopes de células T citotóxicas que juegan un papel muy importante en contra de infecciones virales y lesiones cancerígenas [Ressing *et al.*, 1995].

1.8 CONSTRUCCIÓN DE GENES DE LA PROTEINA L1 DE HPV-16

En el presente trabajo, se utilizaron dos construcciones de vectores de expresión en plantas con versiones del gen de la proteína estructural L1 del virus del papiloma humano-16 (HPV-16), denominado p2300L1MutHPV-16, contiene la versión optimizada del gen de la proteína estructural L1 reportada por Collier [Collier *et al.*, 2002]. Esta labor se realizó en la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV Irapuato, y fueron transfectadas plántulas de jitomate con los genes de la proteína de L1mut descrita por Collier [Collier *et al.* 2002], algunas líneas se transfectaron con el gen L1mut sin alterar y otras líneas se fusionaron con el péptido E6/E7, constituido por cuatro epítopes específicos para linfocitos T citotóxicos provenientes de los genes de E6 y E7 que se expresan durante la infección temprana. Tres de los péptidos utilizados derivan de la oncoproteína E7 del HPV-16 y uno de la proteína E6 del mismo tipo viral; éstos son: el Epítope E7 EIDGPAGQAEPDRAHYNI [Kadish *et al.*, 2002], Epítope E7 RAHYNIVTF [Khammanivong *et al.*, 2003], Epítope E6 PARKLPQLCTELQTTI [Kadish *et al.*, 2002] Epítope E7 TLGIVCPI [Ressing *et al.*, 1995]. Se fusionó traduccionalmente éste péptido E6/E7 al extremo 3' del gen, reemplazando los últimos 34 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína estructural, generando así el gen quimérico L1mutE6/E7 HPV-16. Esta fusión se clonó bajo el promotor constitutivo 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y como terminador se usó la secuencia de poliadenilación del mismo 35S. Éste cassette se clonó en el vector binario de la serie pCAMBIA número 2300 [Paz de la Rosa, 2009].

Después se realizó un proceso de transformación, regeneración y selección de las plantas regenerantes, algunas líneas que expresaban proteína L1mut constituida en partículas tipo virales (VLP) a los cuales denominamos como VLPj y otras líneas de jitomate que expresan la proteína L1 más epítopes de los genes de expresión temprana E6 y E7, que dan como resultado VLP quiméricas o VLPq.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial y nacional el cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por padecimientos oncológicos; aproximadamente 650 mujeres mueren diariamente, cada año se diagnostican 500 mil nuevos casos, y en México en promedio muere una mujer cada dos horas [Universia, 2007]. Estudios epidemiológicos han demostrado que además de otros factores de riesgo, existe una fuerte asociación entre el virus del papiloma humano (HPV) genital y el cáncer cervical, pues se encuentra DNA viral en más del 99% de los casos analizados, y de éstos el 50% pertenece al tipo 16 [Bosch *et al.*, 2003]. En todo el mundo, 630 millones de personas (1 de cada 10) han sido infectadas con el HPV, y más del 50% de los hombres y mujeres sexualmente activos contraerán el HPV en algún momento de su vida [Koutsky, 1997]. Han sido reportadas estadísticas que revelan que las mujeres principalmente afectadas pertenecen en su mayoría a países en vías de desarrollo, y dentro de éstos, a un sector de la población con los más bajos ingresos económicos; por tanto, un monitoreo temprano para prevenir el CaCu resulta imposible o muy poco accesible [Newall *et al.*, 2007].

En México se emitió una norma oficial sobre el control y tratamiento del cáncer cérvico-uterino, que define los lineamientos a seguir tanto en el programa nacional de tamizaje como en el tratamiento de los casos identificados (Subsecretaría de Promoción y Prevención de la salud. NOM-014-SSA2-1994); cada año se realizan en promedio 7.2 millones de tamices anuales mediante citología cervical (papanicolaou) de forma gratuita, de los cuales una fracción de 1.2% resulta positiva. Sin embargo esta es una prueba que tiene poca sensibilidad, siendo que en un 40% de los casos, las mayoría de las veces en etapas tempranas, no se reconoce, asimismo se requiere personal y equipo especializado para asegurar una buena toma e interpretación, que resulta de la capacidad del laboratorista, y los esfuerzos para aumentar la cobertura del programa de tamizaje han arrojado pocos resultados debido a barreras de acceso por cuestiones geográficas y situaciones de percepción cultural [Gutiérrez-Delgado *et al.*, 2007].

En la actualidad en el mercado existen vacunas del tipo profiláctico basadas en la tecnología recombinante, con la que han podido ser sintetizadas partículas similares a HPV (VLPs), constituidas principalmente por las proteínas L1 de los HPV-16, -18, -6 y -11 (vacuna GARDASIL®). Mediante el uso de las VLPs se ha demostrado la generación de anticuerpos con capacidad protectora hacia posibles infecciones por HPV en grupos de personas vacunadas de hecho la efectividad de la vacuna es mayor cuando se aplica a mujeres que no han iniciado vida sexual, dejando fuera a todas aquellas mujeres que ya estén infectadas [Brinkman *et al.*, 2007]. Sin embargo, la actual vacuna comercial tiene un costo muy elevado de manera que si se considerara introducir la vacuna anti-HPV al esquema básico, implicaría incrementar en grado significativo el financiamiento del Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia (CENSIA), y complicaría la obtención de otras vacunas como la antineumococica, la antiinfluenza, y la antirotavirus que se han incorporado recientemente, esta situación motiva el interés de producir nuevas y más baratas vacunas para toda la población [Gutiérrez-Delgado *et al.*, 2007].

Por otra parte los sistemas en que actualmente se producen los VLP son baculovirus o levaduras, bajo costosas condiciones de producción y purificación, que no resultan accesibles para los países en vías de desarrollo, lo que hace deseable el desarrollo de alternativas más adecuadas para estos países. En ese sentido, el uso de plantas para la producción de proteínas gradualmente va ganando aceptación y pueden proveer una plataforma de producción de costo accesible de proteínas en dichos países. Por tanto, se requiere del diseño de sistemas pulidos para la producción de VLP que reduzcan los altos precios de las vacunas.

En consecuencia, en este trabajo se evaluó la respuesta de inmunidad humoral hacia VLPs obtenidas a partir de plantas de jitomate transfectadas con plásmidos que inducen la expresión permanente de estas partículas tanto en forma silvestre (VLPj), como adicionadas con epítopes de la oncoproteína E6 y E7, (VLPq) lo que le confiere a estas partículas la capacidad de generar una respuesta inmune mediada por anticuerpos que además neutralizan igual que la actual vacuna comercial, una posible capacidad terapéutica, por lo que no sólo beneficiarían preventivamente a niñas saludables, sino también a mujeres que ya han tenido contacto con el HPV.

HIPÓTESIS

La transfección de plantas de jitomate con los plásmidos L1mut y L1mutE6E7 dará lugar a la producción de partículas tipo virales (VLPs) con características inmunogénicas semejantes a las de los viriones de HPV-tipo 16; por lo tanto, la inmunización de ratones con estas VLPs tendrá como resultado la generación de anticuerpos con reconocimiento específico por las VLPs obtenidas comercialmente en forma de vacunas. Dichos anticuerpos tendrán además una capacidad neutralizante.

OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Comprobar el efecto de las partículas tipo virales (VLPj) y partículas tipo virales quiméricas (VLPq) extraídas de plantas transgénicas de jitomate, para generar anticuerpos específicos y con capacidad neutralizante, mediante la inmunización de ratones de la cepa C57BL/6.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ☞ Purificar a partir de extractos crudos de jitomate las proteínas L1mut de HPV-16 (VLPj) y las proteínas tipo quiméricas de L1mutE6E7 (VLPq).
- ☞ Inmunizar ratones cepa C57BL/6 con las VLPj y las VLPq tipo quiméricas obtenidas en plantas de jitomate.
- ☞ Estimar la presencia de anticuerpos específicos hacia VLPs obtenidas comercialmente, en sueros de ratones inmunizados con VLPj y VLP quiméricas (VLPq) obtenidas en plantas de jitomate.
- ☞ Determinar la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados por las VLPs obtenidas en plantas de jitomate.

MÉTODOS

5.1 Purificación de VLPj y VLPs tipo quiméricas (VLPq)

5.1.1 Separación de Proteínas IgG por cromatografía de inmunoafinidad

Se purificarón anticuerpos tipo IgG contenidos en el suero de una joven vacunada con Gardasil®, mediante una cromatografía de inmunoafinidad usando una matriz de afinidad de proteína G/sefarosa 4, de flujo rápido (Pharmacia Biotech, USA). Para lo cual primeramente se lavó la matriz con una solución salina de fosfatos (PBS) y después se empacó en columnas de 10mL (Sigma, USA), posteriormente se colocó con el suero de la joven inmunizada con Gardasil® por un periodo de 24 horas en agitación suave a una temperatura de 4°C. A continuación, se procedió a lavar con PBS hasta que ya no se obtuvo ningún residuo de proteína en el eluyente lo cual se determinó mediante lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. Una vez que se hubo alcanzado la lectura de cero en el espectro, de la matriz se extrajeron los anticuerpos, haciendo pasar por la columna un mililitro de solución de glicina 0.1M y ácido clorhídrico (HCl) con un pH entre 3.0 y 2.5; esta fracción de elución se recibió en un tubo para microcentrífuga de 2 mL con buffer de Tris base-HCl a pH 9.0 para tener a un pH neutro entre 7.0 y 7.5. El anticuerpo IgG obtenido se cuantificó de acuerdo a la siguiente relación: una lectura de 1.35 DO a 280 nm equivale a tener un mg de anticuerpo IgG por mililitro de elución [Harlow *et al.*, 1988]. Los tubos colectados se dializaron en un buffer de acoplamiento (0.5M de NaCl, 0.1M de NaHCO₃ a pH 8.3) en una membrana de 12 kD (Pharmacia Biotech, Suecia).

5.1.2 Preparación De Columnas De Purificación

La sefarosa 4B con CNBr (Pharmacia Biotech, Suecia) se encuentra en forma de polvo seco con presencia de aditivos que se eliminan por medio de lavados con un buffer de pH 2.5. Por un gramo de sefarosa se realizaron 4 lavados con 50 ml de buffer con 5 min de agitación, 10 min de centrifugación y se descartó el sobrenadante entre cada lavado. Al término del lavado se agregó el ligando (IgG vs VLP Gardasil®) dializado en buffer de acoplamiento. Se agregó entre 5 y 10 mg de proteína por ml de gel. Se puso en agitación suave durante 24 horas a una temperatura mínima de 4°C. Pasado ese tiempo, se centrifugó, para retirar el sobrenadante, y se realizó un lavado con 30 mL de buffer de acoplamiento, se agitó durante 5 min y se centrifugó para descartar el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 45 mL de buffer de bloqueo (glicina 0.2 M a pH 8.0) y se incubó durante 24 horas en agitación suave y temperatura de 4°C. Transcurridas las 24 horas, se centrifugó durante 4 minutos y retiró el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 25 mL de buffer pH 4 (CH₃COONa 0.1M, NaCl 0.5M), y se llevo a agitación durante 5 minutos, centrifugamos y se descarto el sobrenadante. Después adicionamos 25 ml de buffer pH 8 (Tris-HCl 0.1M, NaCl 0.5M), se agitó durante 5 minutos, centrifugamos y se retiró el sobrenadante, se repitieron los últimos dos pasos tres veces cada uno. Por último, se añadieron 100 ml de PBS y se empaquetó el gel en las columnas de 10 mL (Sigma USA) y almacenamos a 4°C.

5.1.3 Extracción de VLPs de jitomate

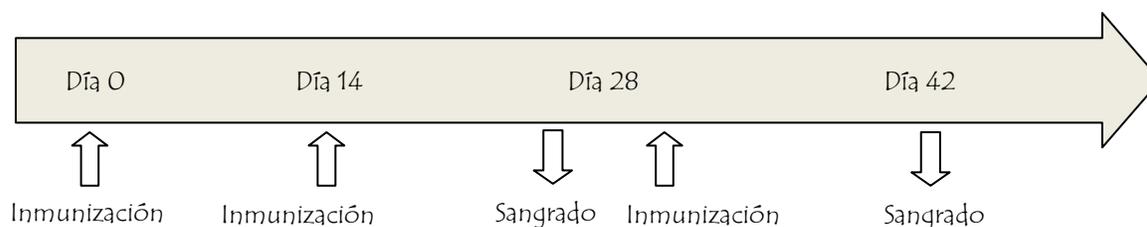
Los frutos de la planta de jitomate fueron congelados con nitrógeno líquido, macerados y puestos en preservación, y en esta presentación son enviados del CINVESTAV de Irapuato al laboratorio de Inmunobiología de la FES-Zaragoza. Para la obtención de las partículas tipo virales (VLP) del tejido, primeramente colocamos 200 gramos de cada lisado de jitomate en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 1L previamente esterilizado, se añadieron 100 ml de PBS y 3 ml de PMSF [1mM], finalmente dejamos en agitación durante 14 horas a una temperatura de 4°C. Este procedimiento se realizó por separado para VLPj como para VLPq. Pasado el tiempo de incubación el extracto se colocó en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó a 3000 r.p.m. por 20 minutos a 4°C. Recuperamos el sobrenadante y después filtramos con ayuda de un filtro de reloj de arena y con una membrana millipore 0.8 µm, así se obtiene un extracto al cual se le hace recircular por un sistema de cromatografía de inmunoafinidad, con ayuda de una bomba peristáltica durante una noche. Pasado el tiempo se detuvo el sistema de circulación y se procedió a lavar la columna hasta que no quedó más rastro o presencia de proteína del jitomate para lo cual se añaden 6ml de Buffer de lavado #1 (TRIS Base 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, detergente NP40 al 0.1%, a pH 7.8) y posteriormente 12 ml de buffer de lavado #2 (TRIS Base 50 mM, EDTA 5 mM, a pH 7.8). Una vez que se lavó la columna, hasta leer cero en la cantidad de proteína con ayuda del espectrofotómetro, se procede a eluir las partículas tipo virales, para lo cual se añadió a la columna 1000 µl de buffer de elución (glicina 100mM a pH 4) y se recibe la fracción en un tubo para microcentrífuga con 12 µl de buffer alcalino (Tris-HCl 100 mM pH 9).

5.1.4 Cuantificación de VLP y VLPq

Para cuantificar las VLP por medio de la técnica del Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA) se estandarizó una curva patrón con las partículas tipo virales de la vacuna comercial Gardasil® (VLP -16, -18, -6 y -11), a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 100, 250 y 500 ng), con 100 µl/pozo por triplicado de cada concentración de la curva y de una dilución 1:50 de las fracciones de los VLP y VLPq obtenidos del jitomate. Se incubó por una noche a una temperatura de 4 °C. Entonces, se realizaron dos lavados con TBS/Tween 20 al 2%, después se bloqueó la placa con albúmina bovina sérica (BSA) al 2% con 300 µl por pozo a continuación se incubó la placa a 37 °C durante 2hrs. Se lavó la placa 4 veces con TBS-Twen 20 al 2% y se añadió el anticuerpo primario (suero de mujer con tres inmunizaciones de Gardasil®) en dilución 1:500, se incubó a 37 °C durante 2hrs. Se realizaron 6 lavados a la placa con TBS-Twen 20 al 2% y después se adicionó el anticuerpo secundario cabra anti- humano acoplado a fosfatasa (Sigma, USA) en una dilución 1:5000; se incubó durante 2hrs a 37 °C. Consecutivamente se lavó 8 veces la placa con TBS-Twen 20 al 2%, y se agregó 100 µl por pozo de agente cromógeno fosfatasa alcalina disuelto en dietanolamina (Sigma, USA) 0.03g por cada 5mL, inmediatamente se incubó a 37 °C en ausencia de luz, durante 1hr, finalmente se detectó la reactividad enzimática de la fosfatasa detectando el color amarillo, la placa se leyó a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Molecular Devices). Los ensayos se realizaron por triplicado, se calculó el promedio y la tendencia a los datos para obtener las concentraciones en µg que se extrajeron del extracto de los jitomates.

5.2. Inmunización de ratones con las VLP y VLPq

Para los ensayos de ELISA y respuesta humoral se trabajó con 4 grupos de 6 ratones cada uno; ratones hembras de la cepa C57BL/6 con 6 a 8 semanas de vida, los cuales se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad. Un grupo se inmunizó intraperitonealmente con 20µl de la vacuna tetravalente Gardasil®, otro por la misma vía, con 200 µl de Adyuvante de Freund (Sigma USA) completo para la primera dosis y para las siguientes incompleto, a un tercer grupo se le administraron 5µg de VLPj de L1 mut de HPV 16 más 250 µl de adyuvante de Freund completo para la primera dosis e incompleto en las siguientes, el cuarto grupo fue inmunizado con 5µg de VLPq de L1 mutE6E7 de HPV 16 más 250 µl de adyuvante de Freund completo para la primera dosis e incompleto en las dos siguientes. Las inmunizaciones se realizaron cada catorce días y después de la segunda se colectaron las muestras de sangre por punción en la vena orbital del ojo, usando tubos capilares sin anticoagulante. Después la sangre fue centrifugada a 5,000 rpm durante 4 min. Al término de este periodo, se colectaron los sueros correspondientes y se almacenaron en ultra congelación (-70°C) hasta su posterior uso, para determinar los títulos de anticuerpos contra el HPV.



Tratamiento		Gardasil (L1 de HPV - 6, -11, -16 y - 18)	VLPj + Adyuvante (L1 de HPV - 16)	VLPq + Adyuvante (L1mutE6E7 HPV-16)	Adyuvante Freund
Día 0	1ª Dosis	20 µl	5 µg	5 µg	Completo
Día 14	2ª Dosis	20 µl	5 µg	5 µg	Incompleto
Día 28	3ª Dosis	20 µl	5 µg	5 µg	Incompleto

5.3 Determinación de anticuerpos anti-VLP de HPV-16

Fijamos una placa de 96 pozos con fondo plano de alta afinidad no estériles sin tapa (Costar USA), con 100µl de PBS a una concentración de 1 µg por mL de VLPs comerciales de la vacuna Gardasil®, además 1 µg por mL de partículas tipo virales extraídas del jitomate VLPj y de VLPq; incubamos toda la noche a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con TBS/Tween 20 al 2%, se bloqueó la placa con albúmina bovina sérica al 2% (Research Organics, USA) con 300 µl por pozo, incubamos a 37°C durante 2hrs. Se prepararon pools de sueros de cada grupo de ratones, consistentes de una mezcla de 10µl del suero de cada uno de los ratones que conforman un grupo, para la segunda y tercera inmunización se realizaron ensayos por separado, de cada pool se realizaron diluciones a las siguientes concentraciones: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600, después se lavó la placa 2 veces con TBS/Tween 20 al 2%, se colocaron por triplicado en la placa e incubamos a 37°C durante 2hrs. Realizamos 2 lavados con TBS/Tween 20 al 2% y adicionamos el anticuerpo secundario cabra anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma, USA), en una dilución 1:5000 e incubamos durante 2hrs a 37°C. Lavamos 2 veces la placa con TBS/Tween 20 al 2%, y agregamos 100 µl por pozo de sustrato de fosfatasa alcalina en dietanolamina (Sigma, USA) 0.03g por cada 5mL, incubamos a 37°C durante 1hr, finalmente leímos la placa en un lector de placas para ELISA (Molecular Devices), a una longitud de onda de 405 nm y analizamos los resultados.

5.4 Determinación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos producidos en ratones inmunizados con VLPs y VLPq

Para verificar la habilidad neutralizante de los anticuerpos obtenidos se realizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Para ello, se colectó sangre de un ratón preinmune en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL, separamos los eritrocitos, por medio de una centrifugación a 1000 rpm durante 5 min a 4°C, después lavamos dos veces con PBS a los eritrocitos, y se éstos se resuspendieron en PBS a una concentración de 0.5% (vol/vol). Por otra parte, 100ng de VLP purificados fueron incubados con varias diluciones (desde 1/100 hasta 1/3200) de los sueros de cada grupo de ratones inmunizado con VLPj, VLPq, o bien VLPg, también se probó con el suero de un ratón preinmune, la mezcla de las VLPs más los sueros se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Pasado este tiempo, se combinó un volumen igual de la suspensión de eritrocitos (150µl) con la mezcla de sueros y VLPs (150µl). Alícuotas de 100µL de ésta mezcla fueron colocadas en un pozo de una placa de fondo U de 96 pozos y se incubó durante tres horas a 4°C. La formación de nubes o redes de eritrocitos indican la aglutinación de los eritrocitos mediada por los VLPs y la ausencia de las mismas, indica la neutralización debida a la presencia de anticuerpos, lo cual se documentó por fotografías.

RESULTADOS

6.1 PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VLPS

Las proteínas solubilizadas de L1mut (VLPj) y L1mutE6E7 (VLPq) se purificaron por cromatografía de afinidad, éstas se eluyeron en dos fracciones de 1 mL cada una, utilizando glicina 100 mM pH 4, y se neutralizaron con TRIS-base para llevar a pH neutro (por cada 200g de tejido se realizaron 6 eluciones dejando un intervalo entre cada dos, de 24hrs, para que la columna de Sefarosa se volviera a cargar con las partículas del extracto). Las fracciones de elución se cuantificaron por medio de un ELISA en el que se estandarizó una curva patrón con las proteínas certificadas de la vacuna tetravalente (HPV-16, -18, -6, y -11) Gardasil® (figura 1), con la cual se obtuvieron lecturas de absorbancia para cantidades conocidas de proteína y bajo estas condiciones se realizó la tendencia que cuantificó la cantidad de proteína de VLP por mililitro de elución que se obtuvo del tejido de jitomate transfectado con los plásmidos de L1mut y L1mutE6E7 (figura 2, 3, 4, y 5).

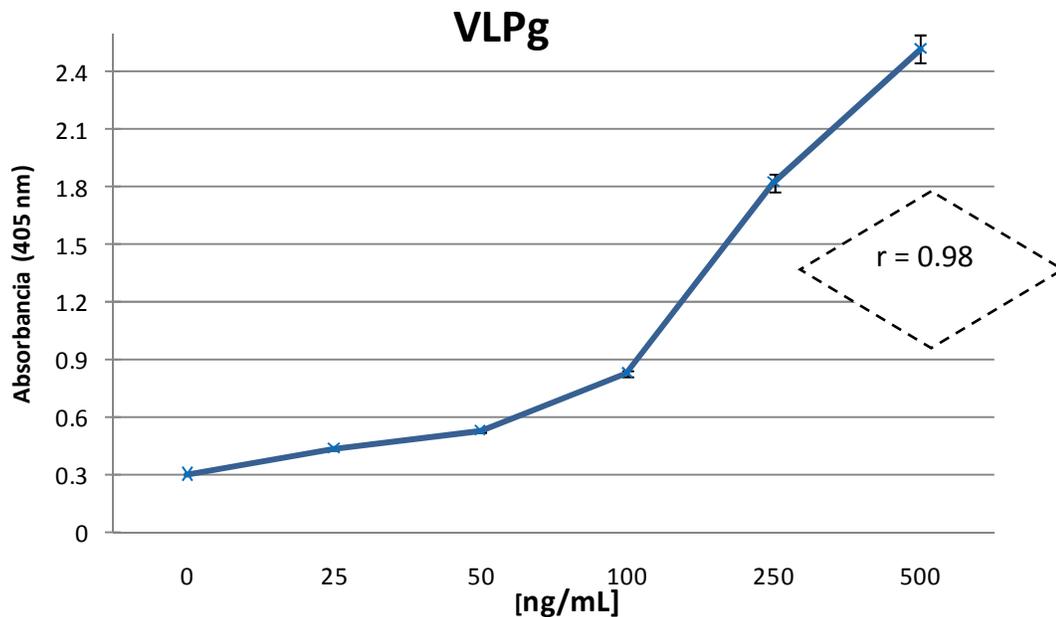


Figura 1. Curva de Titulación por ELISA de VLPg de la vacuna Tetravalente Gardasil®, con un coeficiente de correlación de 0.98. Donde cada punto representa el promedio de tres lecturas de absorbancia para una concentración de proteína conocida.

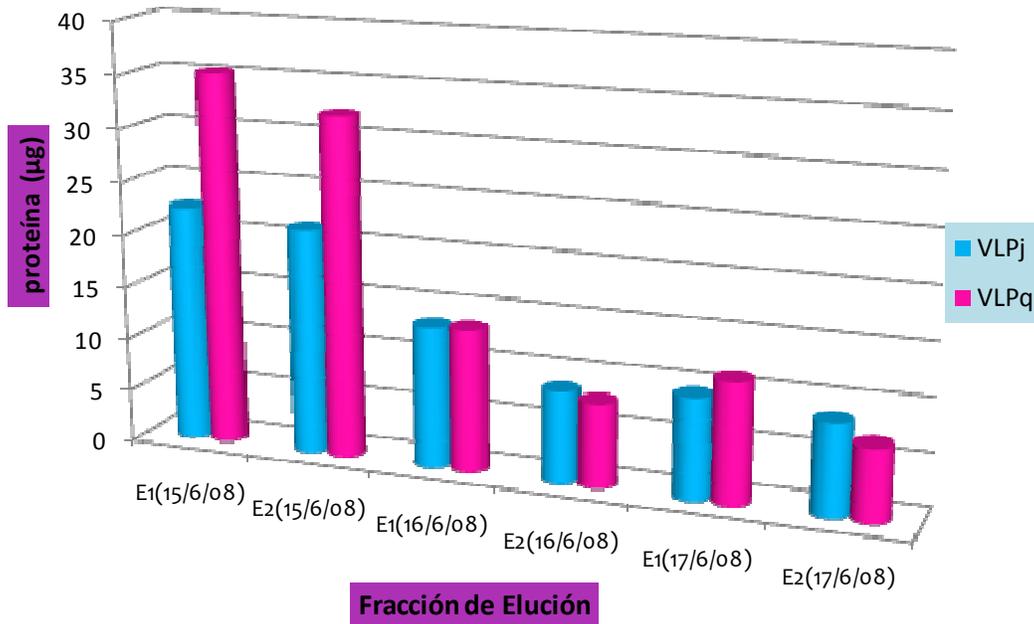


Figura 2. Cantidad de proteína tipo L1 HPV-16 obtenida en las eluciones realizadas por cada 200g de tejido. Cada barra representa la cantidad de proteína por fracción de un mililitro de elución de la fecha señalada (E1: fracción 1; E2:fracción 2). Por 200g de tejido de jitomate se obtuvieron en total 83.7 µg de VLPj purificadas. De VIPq se obtuvieron 107 µg totales.

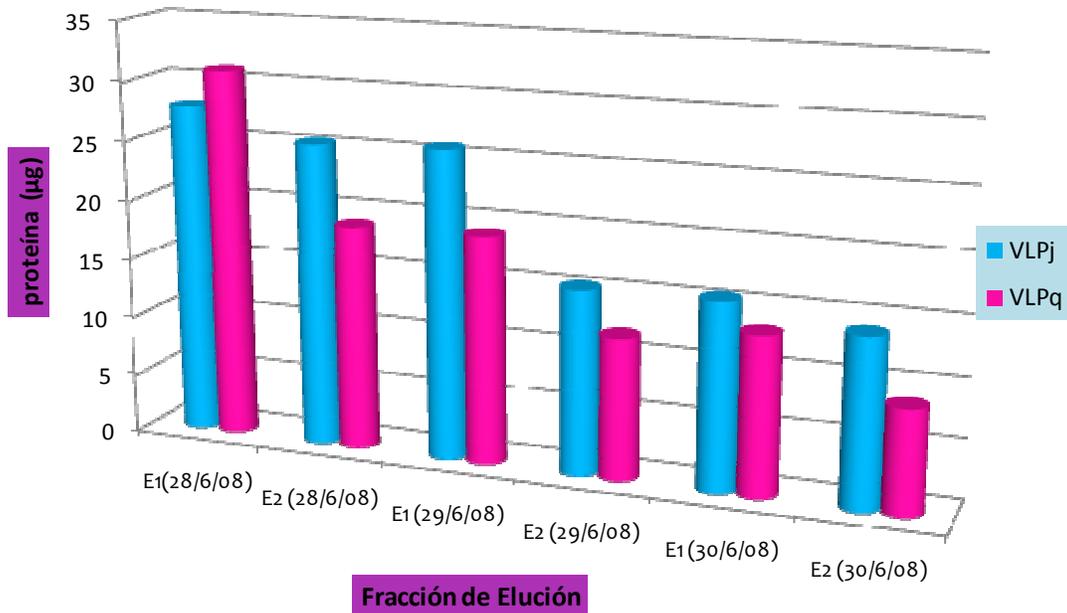


Figura 3. Cantidad de proteína tipo L1 HPV-16 obtenida en las eluciones realizadas por cada 200g de tejido. Cada barra representa un mililitro de elución obtenida en la fecha señalada. En otra purificación realizada se tuvo que de 200g de tejido de jitomate se obtuvieron en total 124.06 µg de VLPj purificadas. Por otro lado de VIPq se obtuvieron 94 µg totales.

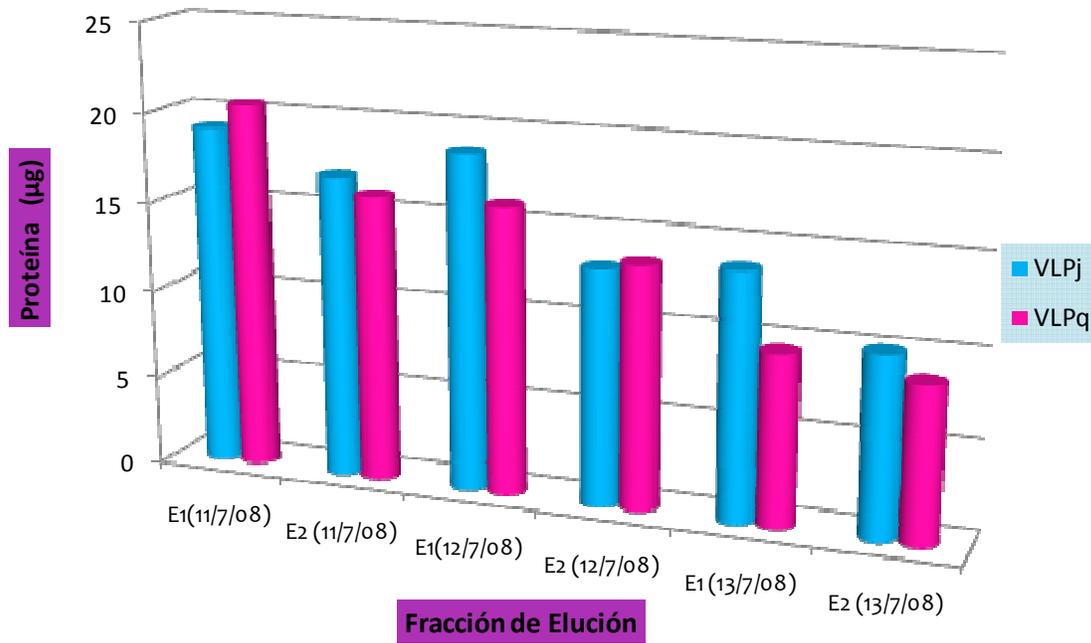


Figura 4. Cada barra rosa representa un mililitro de elución de VLPq que al sumar todos los valores la cantidad de proteína es igual a 84.2 µg y para la sumatoria de las eluciones de VLPj (barras azules) nos da 91.5 µg totales de proteína, estas VLPs fueron obtenidas de aproximadamente 200g de tejido de jitomate transfectado.

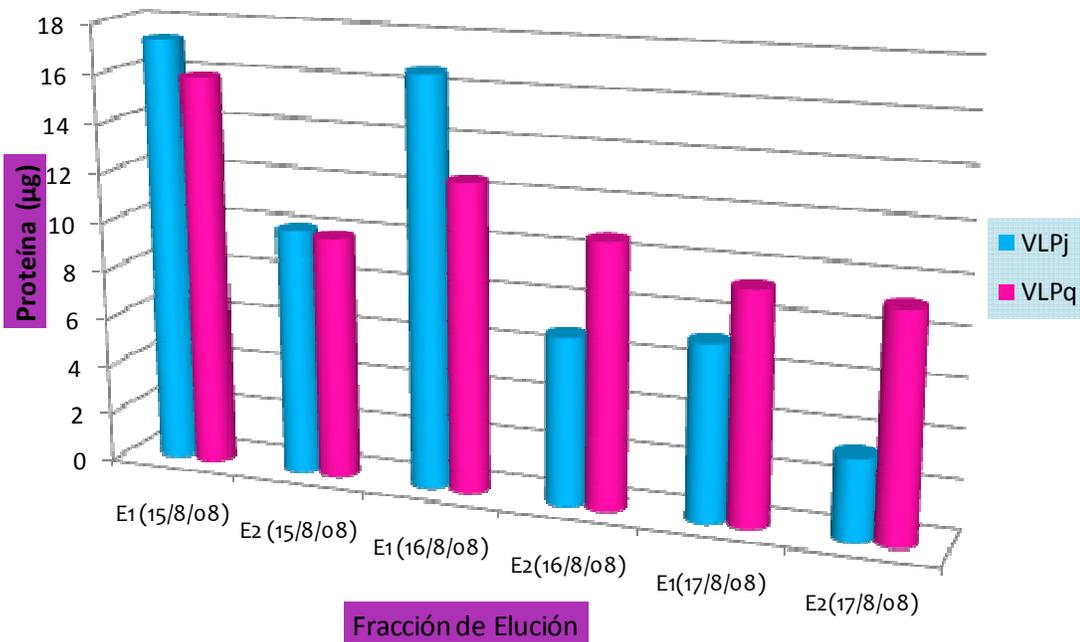


Figura 5. En el gráfico se aprecian las concentraciones por mililitro de las proteínas VLPj que en total suman 67.4 µg, del otro lado la sumatoria de la concentración de VLPq es igual a 61.2µg por cada 200g de tejido totales.

6.2 RESPUESTA HUMORAL GENERADA POR LAS VLPs DE JITOMATE

6.2.1 ANTICUERPOS IgG DESPUÉS DE LA SEGUNDA INMUNIZACIÓN

TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS A VLPg de HPV-16, -18, -11 y -6

Para la realización de este experimento fueron inmunizados 4 grupos de 6 ratones: el primero con las VLP extraídas de la planta de jitomate transfectada VLPj; el segundo con VLPq (L1mutE6/E7); como control positivo se inmunizó a un tercer grupo con la vacuna Gardasil® que contiene los tipos de HPV-16, -18, -6, y -11 (VLPg), y como control negativo al cuarto grupo sólo se le administró el adyuvante que acompañó la inmunización de las VLP de jitomate. Mediante el ensayo de ELISA se realizó una titulación de los anticuerpos en los sueros de los ratones después de dos inmunizaciones, usando como antígenos las partículas de VLPg donde los títulos obtenidos para nuestro control positivo van desde un valor de 1.76 DO (densidad óptica) con la dilución de 1:50 (figura 6). Por otra parte el grupo inmunizado con VLPj se aproximó más a los valores del control positivo, puesto que a una dilución de 1:50 se aprecia una DO de 0.882 un valor similar al del control positivo con una dilución de 1:800, y conforme se diluye más el suero se tiene que a una concentración de 1:200 los anticuerpos ya no emiten una absorbancia significativa. En el caso de los sueros provenientes de ratones inmunizados con VLPq se observa para la dilución de 1:50 con un valor de 0.671 DO, lo que nos indica un ligero pero considerable reconocimiento de los anticuerpos generados con VLPq hacia las VLPs comerciales, sin embargo conforme se diluye más el suero, los valores de densidad óptica se aproximan más a los del control negativo que tienen un valor de 0.455 DO para la dilución de 1:50 (suero de ratones inumizados con Adyuvante).

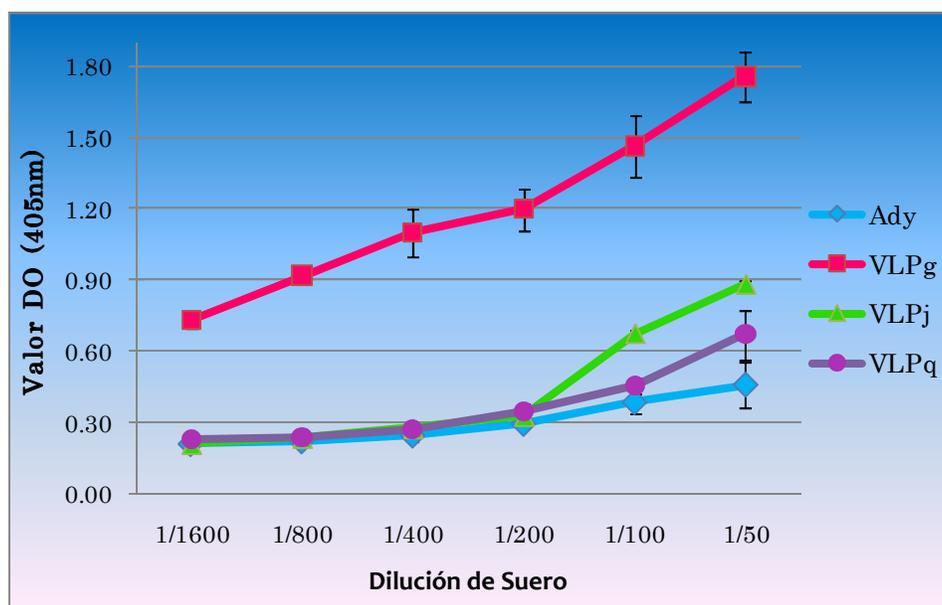


Figura 6. Detección de anticuerpos IgG específicos a partículas tipo virus de Gardasil® (VLPg) en suero de ratones con dos inmunizaciones. **Ady:** grupo inmunizado con adyuvante (control negativo). **VLPj:** suero procedente de ratones inmunizados con VLPs extraídas de jitomate que sólo contienen proteína L1 y, **VLPq:** ratones inmunizados con las VLP de L1E6/E7 también expresadas en jitomate.

TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS A VLPj [L1mut DE HPV-16]

Para continuar la evaluación del reconocimiento antígeno-anticuerpo, los sueros de los cuatro grupos de ratones inmunizados fueron incluidos en un ELISA, esta vez fijando como antígeno las VLPj. Se obtuvo que los sueros provenientes de los ratones inmunizados con VLPj, tuvieron los títulos más altos tales que, en la dilución 1:50 el valor de densidad óptica es igual a 1.026 y para la dilución 1:800 se aprecia una lectura igual a 0.264 DO, valor que ya es muy semejante al del control negativo (Adyuvante). Además, los sueros del grupo de los ratones inmunizados con VLPq tuvieron un título mayor que el del control positivo: VLPg, siendo las lecturas 0.897 DO y 0.741DO para la dilución 1:50 respectivamente, estos descendieron a partir de la dilución 1:400 donde el valor de densidad óptica ya es similar al de el grupo de Ady (figura 7)

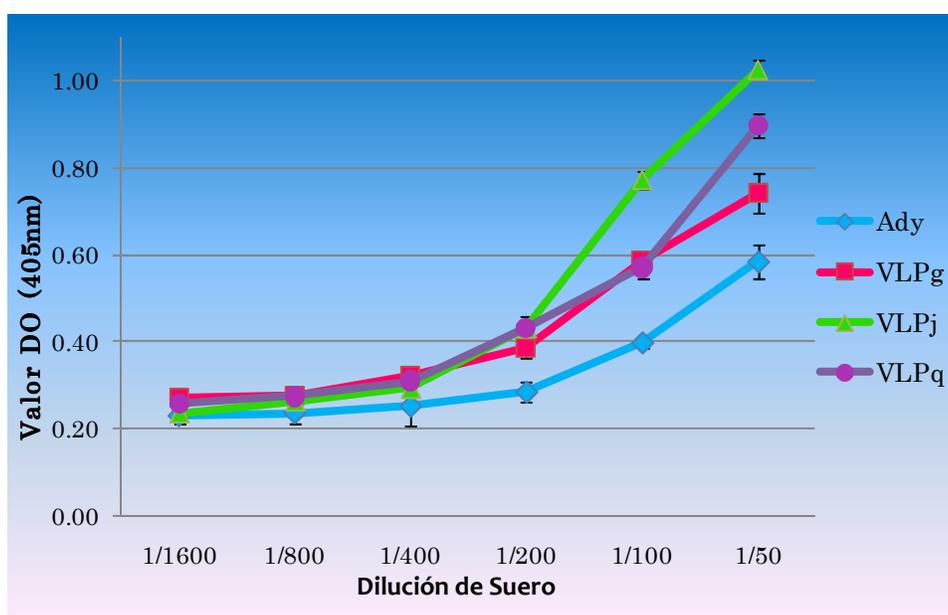


Figura 7. Titulación de anticuerpos contra reconocimiento de VLPj como antígeno. Los puntos que se muestran son el promedio de tres ensayos. **Ady**, suero de los ratones que forman el control negativo. **VLPg**, control positivo suero de ratones inmunizados con Gardasil®. **VLPj**, suero procedente de ratones inmunizados con VLPj y **VLPq** suero de ratones inmunizados con las VLPq.

TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS A VLPq [L1mutE6E7 DE HPV-16]

Los sueros de los 4 grupos con dos inmunizaciones previas, también fueron evaluados para detectar la presencia de anticuerpos específicos para las VLPq: aquellas partículas virales que además de tener a la proteína L1 también expresan epítopos de las oncoproteínas E6 y E7. Los resultados obtenidos demuestran que el mayor valor de densidad óptica fue obtenido en los sueros del grupo de ratones inmunizados con VLPj arrojando el valor de 1.18 DO para la dilución 1:50, que se mantiene por encima de los demás grupos hasta la dilución 1:400 con un valor de DO de 0.303. En el caso del suero del grupo VLPq el valor de titulación promedio para la dilución 1:50 es igual a 0.997 DO, de ahí las diluciones arrojan valores muy similares a los del grupo VLPg, el cual tuvo un título de 0.757 DO con dilución 1:50, y para la dilución 1:400 el valor es igual a 0.291. El grupo de Ady presentó los valores más bajos siendo el título de la dilución 1:50 de 0.572 DO y para la dilución 1:400 de 0.253 (figura 8).

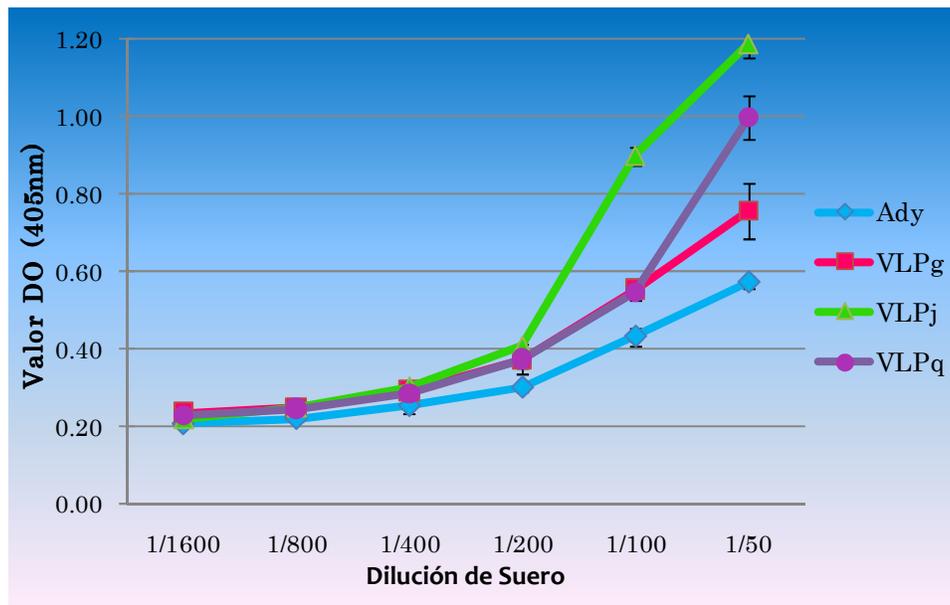


Figura 8. Titulación de anticuerpos contra las partículas de VLPq. **Ady**, suero de los ratones que forman el control negativo. **VLPg**, control positivo suero de ratones inmunizados con Gardasil®. **VLPj**, suero procedente de ratones inmunizados con VLPj y **VLPq** suero de ratones inmunizados con las VLPq. Cada punto rerepresenta el promedio de tres valores.

6.3.2 ANTICUERPOS IgG DESPUÉS DE LA TERCERA INMUNIZACIÓN

TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS A VLPg

Una vez que se administraron tres inmunizaciones a cada grupo con su respectivo antígeno, se colectó sangre de los ratones y se separó el suero, para evaluar los valores de titulación de anticuerpos específicos a VLPg. El grupo inmunizado con VLPg para la dilución del suero 1:50 tuvo un valor de 2.74 DO y la dilución 1:1600 fue 1.23 DO, la línea de titulación para este grupo se aprecia por encima de los otros grupos. Los valores del grupo VLPj se acercaron con una dilución 1:50 siendo este valor es de 2.44 DO, sin embargo conforme se diluye el suero los valores disminuyen significativamente alejándose de la línea del grupo VLPg, así el último valor obtenido para la dilución 1:1600 es de 0.332 DO. El grupo VLPq sólo alcanzó el valor de 1.085 DO para la dilución 1:50 y con la dilución 1:1600 es de 0.251 DO. El grupo de Ady con la dilución 1:50 obtuvo 0.605 DO y para 1:1600 un valor de 0.218 DO.

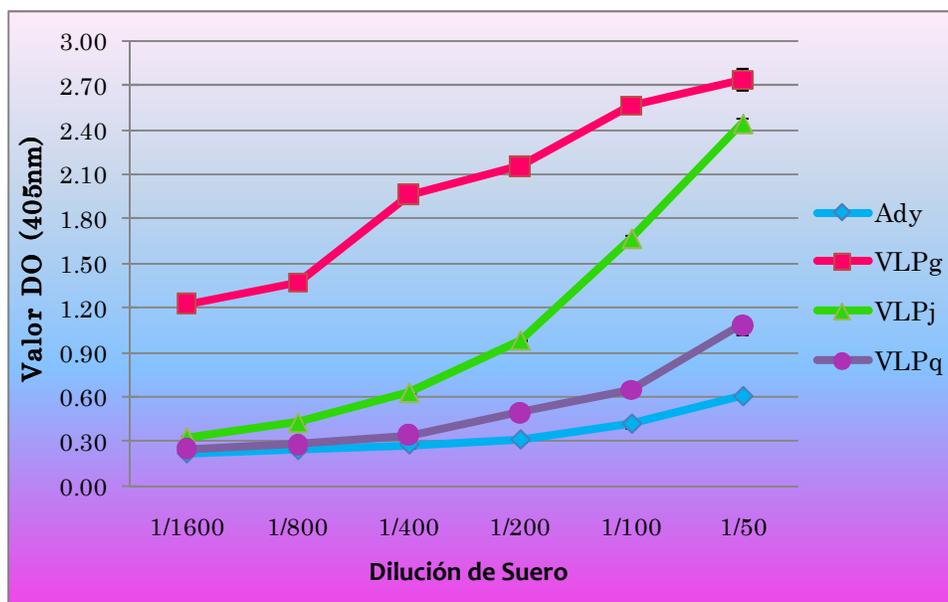


Figura 9. Titulación de anticuerpos contra VLPg, generados en ratones inmunizados tres inmunizaciones. **Ady**, suero de los ratones que forman el control negativo. **VLPg**, control positivo suero de ratones inmunizados con Gardasil®. **VLPj**, suero procedente de ratones inmunizados con VLPj y **VLPq** suero de ratones inmunizados con las VLPq. Cada punto rerepresenta el promedio de tres valores.

TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS A VLPj

Prosiguiendo con la evaluación del reconocimiento antígeno-anticuerpo se realizó otro ELISA, esta vez fijando como antígeno las VLPj . Se obtuvo que los sueros provenientes de los ratones inmunizados con VLPj, tuvieron los títulos más altos tales que, en la dilución 1:50 el valor de absorbancia es igual a 3.454 nm y con la dilución 1:1600 se aprecia una lectura igual a 0.654 DO, con lo que se observa un claro aumento de titulación con respecto al ensayo realizado sólo con dos inmunizaciones previas. Además, los sueros del grupo de los ratones inmunizados con VLPq tuvieron 1.43 DO para la dilución 1:50, valor que también aumentó con respecto al número de inmunizaciones; la línea de titulación se mantuvo por encima del grupo Ady hasta la dilución 1:800 que tiene una DO 0.442 . El grupo VLPg obtuvo 1.300 DO para la dilución 1:50 y 0.289 DO para la dilución 1:1600. La línea de titulación se desplazó por debajo de los títulos obtenidos para el grupo VLPq, pero sí sobrepasó los obtenidos por el grupo Ady, el cual obtuvo 0.942 DO con dilución de suero 1:50 y para dilución 1:1600 es de 0.249 DO.

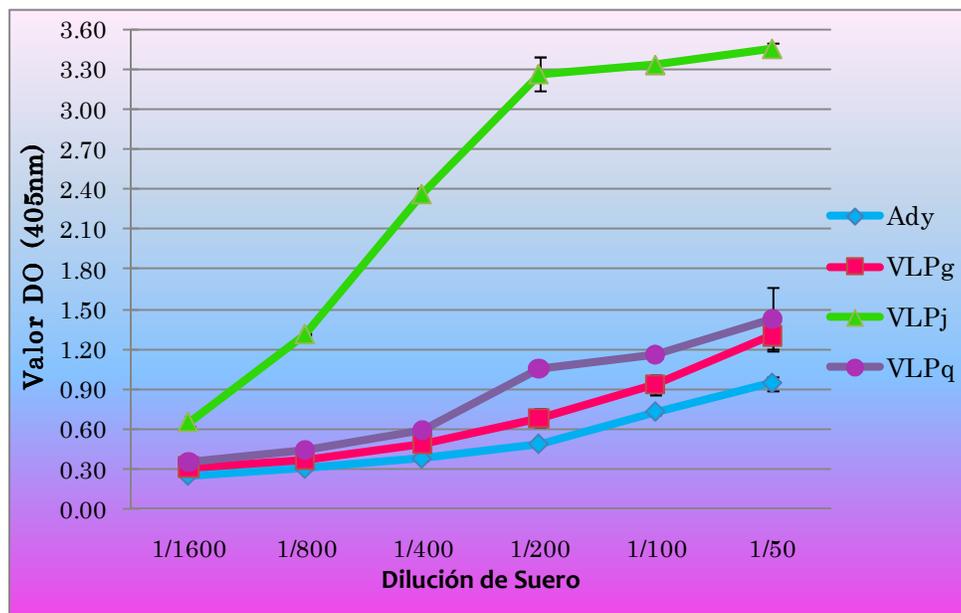


Figura 10. Titulación de anticuerpos contra las partículas de VLPj. Cada punto rerepresenta el promedio de tres ensayos. Los valores más altos de densidad óptica son apreciados en el grupo de VLPj, mayores a los apreciados en la figura 7. **Ady**, suero de los ratones que forman el control negativo. **VLPg**, control positivo suero de ratones inmunizados con Gardasil®. **VLPj**, suero procedente de ratones inmunizados con VLPj y **VLPq** suero de ratones inmunizados con las VLPq.

TITULACIÓN DE ANTICUERPOS IgG ESPECÍFICOS A L1mutE6E7 DE HPV-16

Los sueros de los 4 grupos con tres inmunizaciones previas, también fueron evaluados para detectar el reconocimiento de anticuerpos IgG específicos a VLPq. Los resultados obtenidos demuestran que el mayor valor de densidad óptica fue medido en los sueros del grupo de ratones inmunizados con VLPj, al igual que con dos inmunizaciones y cabe señalar que estos valores aumentaron en un cien por ciento, arrojando el valor de 2.758 DO para la dilución 1:50 y se mantienen por encima de los títulos de los otros grupos, el valor obtenido con la dilución 1:1600 es de 0.351. En el caso del suero del grupo VLPq el valor de titulación promedio para la dilución 1:50 es igual a 1.713 DO valor que también aumentó, de ahí las diluciones arrojan valores ligeramente mayores a del los del grupo VLPg, hasta la dilución 1:1600 el valor es de 0.272 DO. El grupo de VLP g tuvo un valor de 1.341 DO con dilución 1:50, y para la dilución 1:1600 el valor es igual a 0.280 DO. El grupo de Ady presentó los valores para dilución 1:50 de 1.011 DO y para la dilución 1:1600 de 0.217

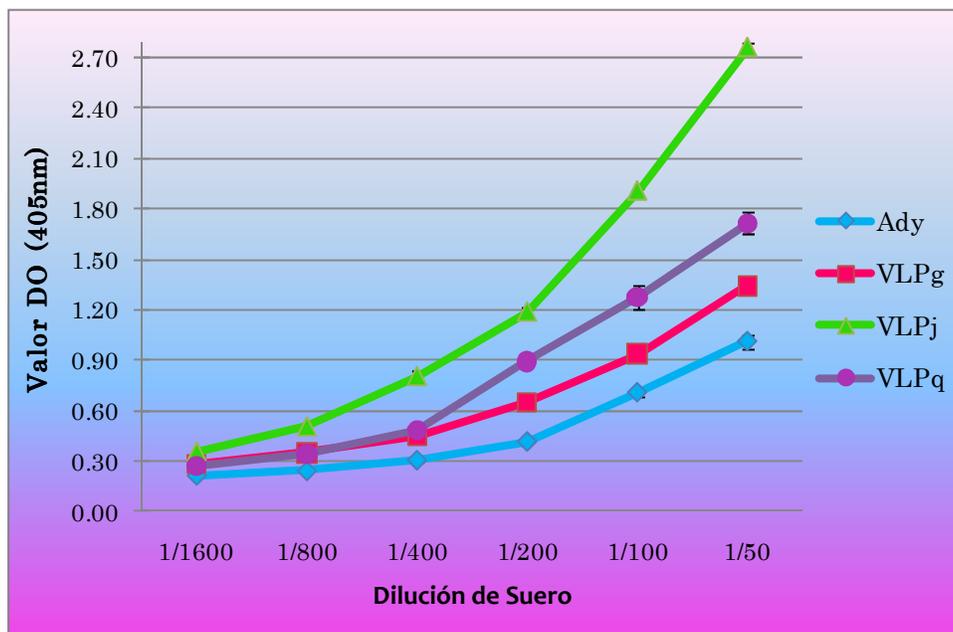


Figura 11. Titulación de anticuerpos contra las partículas de VLPq. Cada punto rerepresenta el promedio de tres valores. Los valores más altos de densidad óptica son apreciados en el grupo de VLPj. **Ady**, suero de los ratones que forman el control negativo. **VLPg**, control positivo suero de ratones inmunizados con Gardasil®. **VLPj**, suero procedente de ratones inmunizados con VLPj y **VLPq** suero de ratones inmunizados con las VLPq.

6.4 ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE LOS ANTICUERPOS

Para evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos se realizaron dos ensayos de inhibición de la hemaglutinación; eritrocitos de ratón aglutinan en presencia de VLPs formados por la proteína L1 de los HPV debido a que dichas partículas unen a receptores de membrana como el heparan sulfato [Bousargin, 2003]. Si la incubación previa de las VLPs con anticuerpos da como resultado la inhibición de la aglutinación, se puede inferir que dichos anticuerpos interfieren con la unión de las VLP con los receptores y por tanto, tendrán la capacidad de evitar su unión con las células blanco; es decir, son neutralizantes. En la figuras 12 y 13 observamos que en ausencia de VLPs (E +PBS) los eritrocitos sedimentan, lo que indica una ausencia de hemaglutinación. Cuando los eritrocitos fueron incubados con los diferentes tipos de VLPs, sin previa incubación con anticuerpos ocurre la hemaglutinación (E+VLPj, E+VLPq, E+VLPg). El ensayo se realizó a diferentes diluciones del suero de los ratones que van desde 1:3200 hasta 1:100; en nuestro grupo control (VLPg: suero de ratones inmunizados con Gardasil) observamos que hay neutralización hasta 1:400, y comparativamente, los sueros de los ratones inmunizados con las VLPj y VLPq también inhiben la aglutinación hasta la dilución 1:400. En contraste, en el suero de un ratón pre-inmune no observamos la actividad inhibidora de la hemaglutinación.

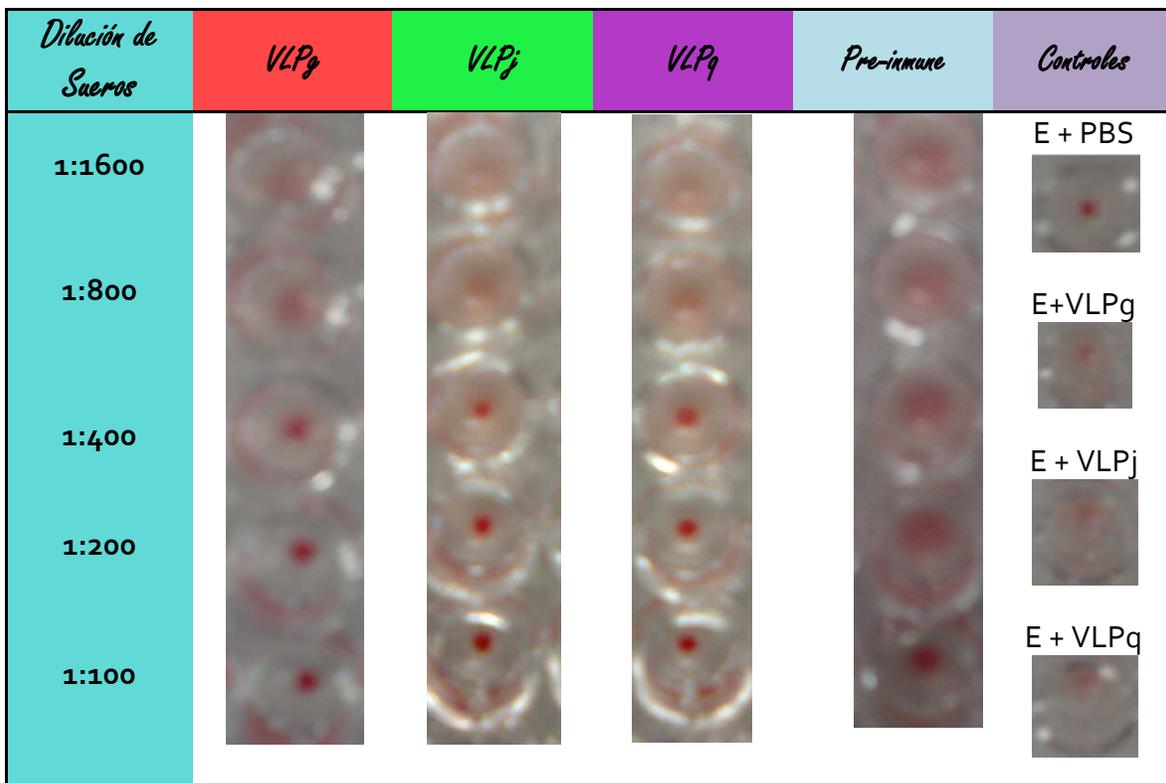


Figura 12. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación, diluciones de suero de 1:1600 hasta 1:100 se incubaron con 100µg de VLPg, 100µl de estas diluciones se mezclaron con 100µl de dilución de Eritrocitos al 0.5% (E+PBS: dilución de eritrocitos, E+VLPg: Eritrocitos de ratón incubados con VLP de la vacuna Gardasil®, E+VLPj: eritrocitos de ratón incubados con VLPs obtenidas en jitomate, E+VLPq eritrocitos incubados con VLP quiméricas).

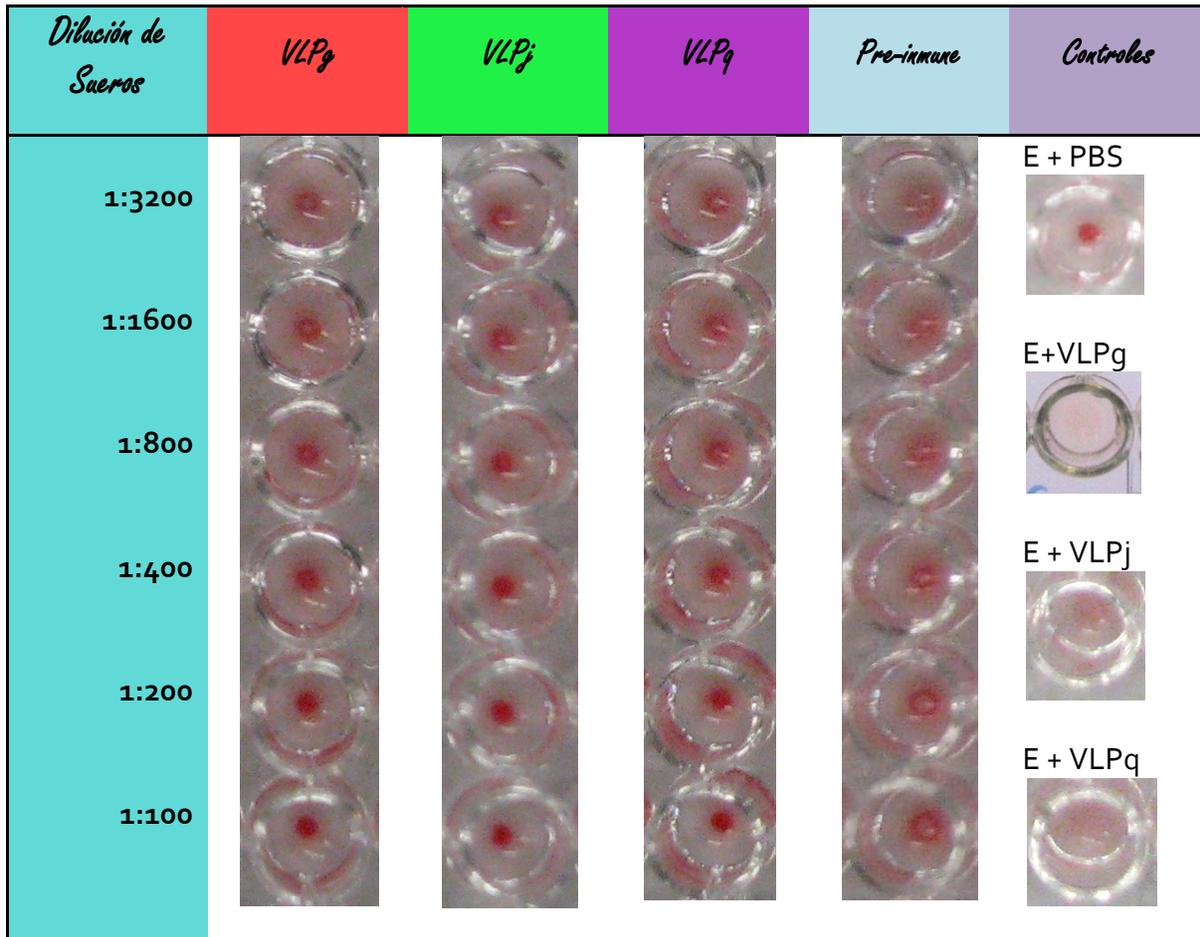


Figura 13. Ensayo de inhibición de hemaglutinación, varias diluciones de sueros (de 1:3200 hasta 1:100) de los diferentes grupos (VLPg, VLPq, VLPj y un grupo control testigo no inmunizado) se incubaron con 100µg de su respectiva VLP, a 100µl de estas diluciones se les añadió 100 µl de dilución de Eritrocitos al 0.5%.se colocaron por triplicado en pozos de fondo U. (E+PBS: dilución de eritrocitos, E+VLPg: Eritrocitos de ratón incubados con VLP de la vacuna Gardasil®, E+VLPj: eritrocitos de ratón incubados con VLPs obtenidas en jitomate, E+VLPq eritrocitos incubados con VLP quiméricas).

DISCUSIÓN

La expresión de la proteína L₁, principal componente de la cápside del HPV-16, en células eucariotas resulta en la formación de estructuras icosaédricas compuestas únicamente por proteína (VLP) por lo que tras la inmunización con éstas se puede obtener una fuerte respuesta sistémica de anticuerpos neutralizantes específicos a L₁ [Schreckenberger y Kaufmann, 2004]. Además de que la respuesta mediada por células inmunes es mensurable, es decir más alta después de la vacunación con VLP, ya que se puede activar la respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC), pues los VLP inducen a las células dendríticas a presentar epítopes a los CTL, de manera que las respuestas inmunes mediadas por células se correlacionan con los niveles de anticuerpos neutralizantes [Pinto *et al.*, 2003].

Las propiedades de las partículas tipo virales del HPV de alto riesgo hacen que éstas representen una gran promesa para contrarrestar los estragos ocasionados por la infección con estos virus; de hecho, ya existen dos vacunas en el mercado, sin embargo, sus propiedades no pasan de ser del tipo profiláctico, de manera que sólo abarcan a un sector de la población femenil que aún no inicia su vida sexual, dejando fuera al sector de la población que más esfuerzos requiere para ser atendido: personas que ya tienen infecciones persistentes o incluso una displasia debida a tal infección. Aunado a ello, se pone que los costos para aplicarse el tratamiento completo se quedan muy lejos del alcance del bolsillo, para el sector público de bajos recursos, que es finalmente el más afectado [Agosti y Goldie, 2007; Thomas y Smith, 2008].

En lo que respecta a la rentabilidad de la producción de las VLP, las vacunas actuales (Gardasil® y Cervarix®) son obtenidas mediante la transfección de levaduras y de células de insecto con un sistema de baculovirus correspondientemente, lo que representa el montaje de sistemas sumamente complejos, donde independientemente de un alto rendimiento se requiere de múltiples tratamientos para depurar contaminantes, y como consecuencia se ve reflejado en el alto costo de la vacuna como producto. Alternativamente, se ha venido buscando la expresión de VLPs en sistemas vegetales, puesto que representa menores costos, el mantenimiento y crecimiento de las plantas comparadas con los sistemas recombinantes de producción usando cultivo de células animales, fermentadores microbianos o animales transgénicos. Además, aun cuando las dos vacunas que ya se encuentran disponibles comercialmente se muestran como suficientemente inmunogénicas, capaces de prevenir infecciones de HPV-AR, pueden ser optimizadas para alcanzar una capacidad terapéutica. Buscando su optimización, han sido diseñadas partículas tipo virales quiméricas que además de expresar a las proteínas de la cápside (L₁ y/o L₂), se les pueden insertar epítopos activadores de células citotóxicas.

Por tanto, en este trabajo se emplearon construcciones de DNA diseñadas en la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV Irapuato, basadas en los genes de la proteína de L₁mut descrita por Collier *et al* (2002), fusionados o no, con el péptido E6/E7 (VLP y VLPq), constituido por cuatro epítopes específicos para linfocitos T citotóxicos

provenientes de los genes de E6 y E7 de HPV, con las que fueron transfectadas plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum L.*). Mientras que en el Laboratorio de Inmunobiología de la FES-Zaragoza UNAM nos dimos a la labor de purificar y probar la inmunogenicidad de los productos obtenidos en modelos vivos de ratón.

Por otra parte en lo que respecta a la cantidad de VLP purificada a partir de dichas plántulas de jitomate transfectadas permanentemente, va de niveles de expresión de 0.02% a 0.1% de proteína soluble total, al compararlo con trabajos previos donde se expresa las VLPs en otro tipo de vegetales como lo es en plantas de papa, donde obtuvieron una expresión de la proteína en un porcentaje que va de 0.1- 0.2% de proteína total soluble y en planta de tabaco con 0.034 – 0.076% de proteína total soluble observamos que nuestros datos obtenidos son similares con los anteriormente mencionados [Biemelt *et al.*, 2003; Warzecha *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005]. Sin embargo al compararlos con el trabajo realizado por Maclean la diferencia es discrepante ya que ellos obtienen un 11% de proteína total soluble gracias a que, transformaron transitoriamente la expresión en cloroplastos [Maclean *et al.*, 2007]. Como posibles estrategias para aumentar los niveles de expresión en un sistema estable, se puede intentar la eliminación de la secuencia de localización nuclear como se reportó para el caso del gen de la proteína L1HPV-11 [Warzecha *et al.*, 2003, Kohl *et al.*, 2007] o dirigir la acumulación de la proteína heteróloga hacia cloroplasto [Azhakanandam *et al.*, 2007, Maclean *et al.*, 2007]. El siguiente paso en este trabajo es expresar las VLPs en cloroplastos.

Sin embargo, con la realización de este trabajo se expone que es posible la obtención de VLPs de los frutos de las plantas de jitomate, en forma más sencilla que la requerida para purificar las mismas partículas a partir de lisados de bacterias o células de insecto. Debido a que en nuestro sistema las proteínas L1 son dirigidas hacia el retículo endoplásmico de las células del jitomate, se facilita el ensamblaje y la secreción de las VLPs al medio extracelular. De manera que para liberar a las VLPs basta con emplear un proceso mecánico de congelación y desintegración (moler el tejido) para que en agitación mecánica durante algunas horas se solubilizan las VLPs en el buffer de fosfatos en donde la estructura se mantiene estable. Además la purificación se realizó mediante una cromatografía de afinidad, y como resultado, las VLPs tienen una conformación que puede ser reconocida por anticuerpos generados por la inmunización de ratones con la vacuna Gardasil®, lo que significa que son conservados los epítopos o sitios antigénicos, lo que es muy importante para fines de vacunación. [Shi *et al.*, 2005]. Además, la preservación de los sitios antigénicos en nuestras VLPs nos sugiere que presentan una adecuada conformación estructural y un correcto plegamiento de la VLP, lo que es el requisito más importante para su eficacia como vacuna, así como si se emplea como antígeno para pruebas serológicas [Kim *et al.*, 2009].

Los anticuerpos específicos hacia nuestros VLPs fueron generados mediante un esquema de inmunización de 0, 14 y 28 días, donde, como se esperaba, aumentó el reconocimiento de los antígenos correspondientes en los *ELISAs*, después de cada inmunización. Sin embargo, la especificidad de un anticuerpo no implica necesariamente una actividad neutralizante, pues la neutralización implica más que el reconocimiento del antígeno, la capacidad de impedir la unión o la entrada del patógeno en cuestión a su célula blanco. En este caso, la presencia de anticuerpos

neutralizantes inducidos por la vacunación con VLPs debe impedir la infección de las células basales del epitelio cervical por parte del HPV, y por tanto, las consecuencias que se derivan de ella, que como sabemos pueden llegar hasta la transformación celular. Por tal motivo, resulta sumamente positivo que los anticuerpos generados por la inmunización con nuestras VLPs hayan tenido la capacidad de inhibir la hemaglutinación mediada por VLPs, pues sugiere que tienen una capacidad neutralizante, lo cual es fundamental para ser propuestas como una opción de vacunación.

Por otra parte la cantidad de anticuerpos reflejada por el grupo inmunizado con las VLP comerciales de la vacuna Gardasil® es muy alta al considerar como antígeno de reconocimiento los cuatro tipos virales, mientras que los sueros de los grupos inmunizados con VLPj y el grupo quimera VLPq, se hacen visibles con valores bajos, lo que implica que no hay reconocimiento por los otros tres tipos virales (HPV-18, 11 y -6), los anticuerpos generados por las partículas tipo virales del jitomate son específicos a la proteína de L1 HPV-16, pues al ensayar con las VLPj y VLPq se observa que los mayores valores son alcanzados por los grupos inmunizados por los mismos, y más aún, considerando los buenos valores del grupo inmunizado con VLPg notamos que estos no son inducidos por el tipo VLP de L1 de HPV-16.

Además de que la inmunización de ratones con las VLPj y VLPq genera anticuerpos con especificidad antigénica semejante los producidos por inmunización con la vacuna Gardasil®, también se genera una respuesta citotóxica [Toledo-Guzmán, 2010] dirigida hacia epítopes de proteínas diferentes a la L1 adicionados en las VLP quiméricas, lo cual demuestra que nuestras VLPq son buenas activadoras de la respuesta inmune humoral, además de la respuesta inmune celular. Esta propiedad es importante, ya que ni la vacunación con Gardasil® ni con Cervarix® parecen tener beneficios terapéuticos para las neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), de la cual también se ha demostrado que no tiene ningún efecto terapéutico para las personas ya infectadas con los tipos de HPV contenidos en esta vacuna. Esto no es sorprendente, ya que las vacunas basadas en VLPs hasta ahora nunca tuvieron un propósito terapéutico debido a que las proteínas L1 y L2 no se expresan abundantemente en lesiones NIC más avanzadas.

Acorde con lo anterior, nuestro grupo probó en un modelo *in vivo* contra un reto tumoral que la inmunización con VLPq retarda el crecimiento tumoral hasta en un 50% , y en un 20% en el caso de VLPj [Toledo, 2010]. Estos resultados permiten sugerir que la inmunización con ambos tipos de VLPs obtenidas en este trabajo, induce la generación de linfocitos T citotóxicos específicos para epítopes de las proteínas virales E6/E7 incluido en la VLPq, linfocitos que son esenciales para eliminar células infectadas por el virus o células cancerosas.

Comparativamente, en un trabajo previo realizado por el grupo de Bian y colaboradores, inmunizaron ratones de la misma cepa trabajada en este estudio, con capsómeros de la proteína L1 más epítopes de la oncoproteína E7 expresados en bacteria, y los resultados obtenidos son satisfactorios pues ellos encuentran buenos títulos de anticuerpos, pero que son menores a los obtenidos al inmunizar con nuestras VLPs; asimismo, ellos evaluaron la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados y resultó semejante a la obtenida en este trabajo, hasta una dilución

1:400. Por otra parte frente a desarrollo tumoral provocado por la incubación de células TC-1, el desarrollo del tumor es reducido, y la inmunización con capsómeros produce una respuesta profiláctica y terapéutica. Sin embargo, observamos que la dosis empleada a estos ratones es equivalente al doble de la concentración que nosotros manejamos en este estudio [Bian *et al.*, 2008].

CONCLUSIÓN

Tras la inmunización de las VLPj y VLPq en ratones se realizó un análisis de la respuesta humoral que arrojó resultados muy satisfactorios que nos demuestran que las VLPs obtenidas a partir de plantas de jitomate, son buenas generadoras de altos títulos de anticuerpos del tipo IgG que además presentan buena actividad neutralizante, propiedad que nos sugiere que prevendrá infecciones futuras. Además, esta actividad se combina con la generación de células citotóxicas, de manera que la expresión en plantas de genes de virus infectantes como lo es el HPV representa una importante fuente alterna de material para comenzar a sintetizar posibles vacunas de carácter profiláctico, además de terapéutico.

PERSPECTIVAS

Es importante continuar con el análisis de las características de la purificación de las VLPs como un producto, pues permite la posibilidad de mejorar la expresión de proteína VLP en el fruto de jitomate. Puede atenderse por ejemplo la optimización de la construcción de DNA, ensayando modificaciones como la remoción de la secuencia de envío a núcleo o la inserción de una secuencia de envío de la proteína en cloroplasto.

También se plantea probar otros epítopes para determinar aquellos más inmunogénicos y particularmente los que sean más representativos para la población mexicana, con lo que además sería posible disminuir el tamaño del inserto para el gen. Del mismo modo será interesante para un trabajo futuro probar diferentes combinaciones para el orden de los epítopes usados en este trabajo para investigar si de esta forma la respuesta inmune puede aumentarse.

Finalmente, se plantea la posibilidad de proponer la técnica de purificación de VLPs para manejarla a una escala industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS, (2003), “Inmunología Celular y Molecular”, 4ª ed, Saunders Elsevier, Madrid, pp 189-193.
- [2] Abbas KA, Lichtman A, Pillai S, (2007), “Cellular and Molecular Immunology”, 6ª ed, Saunders Elsevier, Philadelphia USA, pp 556.
- [3] Agosti JM y Goldie SJ, (2007), “Introducing HPV vaccine in developing countries – key challenges and issues”, *New England Journal of Medicine*; 356: 1908 -1910.
- [4] Alonso P, Hernández M, Lazcano E, (2000), “Cáncer Cervicouterino Diagnóstico, Prevención y Control”, Medica Panamericana, México, pp 59–87.
- [5] Azhakanandam K, Weissinger SM, Nicholson JS, Weissinger A, (2007), “Amplicon-plus targeting technology (APTT) for rapid production of a highly unstable vaccine protein in tobacco plants”, *Plant Molecular Biology*; 63: 393-404.
- [6] Bernard HU, (2002). “Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches”, *Antiviral Therapy*; 7: 219–237.
- [7] Bian T, Wang Y, Zhao L, Ren J, Zhenhua Lu, Zhang H, Ruan L, Tian H, (2008), “Human papillomavirus type 16 L1 E7 chimeric capsomeres have prophylactic and therapeutic efficacy against papillomavirus in mice”, *Journal of Virology*; 7: 1329-1335.
- [8] Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Muller M, (2003), “Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants”, *Journal of Virology*; 77: 9211-9222.
- [9] Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, (2007), “The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer”, *American Journal of Clinical Pathology*; 55: 244-265.
- [10] Brentjens M, Yeung-Yue K, Lee P, Tryring S, (2002), “Human Papillomavirus: a review. Dermatologic Clinics”, Universidad de Texas; 20: 315-331.
- [11] Brinkman JA, Hughes SH, Stone P, (2007), “Therapeutic vaccination for HPV induced cervical cancer”, *Disease Markers*; 23: 337-352.
- [12] Buitrago-Pérez, Garaulet G, Vázquez-Carballo A, Paramio MJ, García-Escudero R, (2009), “Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling”, *Bentham Science Publisher Ltd. Current Genomics*; 10: 26–34.
- [13] Chen SX, Garcea LR, Goldberg I, Casini G, Harrison CS, (2000), “Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16”, *Molecular Cell*; 5: 557-567.
- [14] Cid A. Arregui, (2009), “Therapeutic Vaccines against Human Papillomavirus and Cervical Cancer”, *The Open Virology. Journal*; 3: 67-83.
- [15] Collier B, Öberg D, Zhao X, Schwartz S, (2002), “Specific Inactivation of Inhibitory Sequences in the 5'End of the Human Papillomavirus Type 16 L1 Open Reading Frame Results in Production of High Levels of L1 Protein in Human Epithelial Cells”, *Journal of Virology*; 76: 2739–2752.

- [16] De Palo G, Dexeus S, Chanen W, (2007) "Patología y tratamiento del tracto genital inferior", 2ª ed, Elsevier Masson, Barcelona, pp 50-54.
- [17] Family Health International, (2001), "Expertos de un estudio estadounidense confirman que los condones son eficaces contra el VIH/SIDA", en línea http://www.fhi.org/sp/rh/pubs/network/v21_2/nwvol21-2cndmshiv aids.htm (julio, 2008).
- [18] Fife KH, Wheeler CM, Koutsky, Johnson DA, (2004), "Dose-ranging studies of the safety and immunogenicity of human papillomavirus Type 11 and Type 16 virus-like particle candidate vaccines in young healthy women", *Vaccine*; 22: 2943–2952.
- [19] Franco EL y Sobrinho JP, (1999), "Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer", *Journal Infect Diseases*; 180: 1415-1423.
- [20] Franconi R, Di Bonito P, Muller A, Cirilli A, Venuti A, Giorgi C, (2002), "Plant-derived Human Papillomavirus 16 E7 Oncoprotein Induces Immune Response and Specific Tumor protection", *Cancer Research*; 62: 3654-3658.
- [21] Frazer IH, (2004), "Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination", *Nature Reviews Immunology*; 4: 46–54.
- [22] Galloway DA, (2009), "Human papillomaviruses: a growing field", *Genes Development*; 23: 138-142.
- [23] Garrido LF, Tapia CJ, Sandoval R, (2009), "Rendición de Cuentas en Salud 2008", Secretaría de Salud, México, pp 33–35.
- [24] Genter S, Sterling S, Duensing S, Münger K, Sattler C, Lambert P, (2003), "Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle", *Journal of Virology*; 77: 2832-2842.
- [25] Gomez Lim MA, (2007), "Transgenic plants in therapeutically valuable protein production", *Transgenic Plant Journal*; 1: 256-266.
- [26] Griesser H, Sander H, Walczak C, Hilfrich RA, (2009), "HPV Vaccine Protein L1 Predicts Disease Outcome of High-Risk HPV+ Early Squamous Dysplastic Lesions", *American Journal of Clinical Pathology*; 132: 840-845.
- [27] Gutiérrez-Delgado C, Baéz-Mendoza C, González-Pier E, Prieto-de la Rosa A, Witlen R, (2008), "Generalized cost-effectiveness of preventive interventions against cervical cancer in Mexican women: Results of Markov model from the public sector perspective", *Salud Publica Mex*: 50; 107-118.
- [28] Harlow E y Lane D, (1988), "Antobodies A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, United States, pp3 13-315.
- [29] Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, De Carvalho NS, Teixeira J, Dubin G, (2004) "Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial", *Lancet*; 364: 1757–1765.
- [30] Herrera HH y Restrepo PS, (2007), "El Virus del Papiloma Humano y su Relación con la Neoplasia Cervical Humana", en línea <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v41n3/0032%20virus.PDF>

- [31] Hood EE, Woodard SL, Horn ME, (2002), "Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants – myths and realities", *Current Opinion Biotechnology*; 13: 630-635.
- [32] Janeway CA, Travers Paul, Walport M, Shlomchik M, (2001), "Immunobiology: the immune system in health and disease", 5^a ed, Garland Publishing, New York, pp 258.
- [33] Joshi L y Lopez LC, (2005), "Bioprospecting in plants for engineered proteins", *Current Opinion in Plant Biology*; 8: 223–226.
- [34] Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Burk RD, Romney SL, Johnson A, He W, Angeletti R, Abadi M, (2002), "Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 11: 483-488.
- [35] Kenneth MM, Travers P, Walport M, (2008), "Janeway's Immunobiology", 7^a ed, Garland Science, New York, pp 123-134.
- [36] Khammanivong V, Liu WJ, Rodda SJ, Leggatt Gr, Tindle RW, Frazer IH, Fernando GJ, (2003), "Paucity of functional CTL epitopes in the E7 oncoprotein of cervical cancer associated human papillomavirus type 16", *Immunology and Cell Biology*; 81: 1-7.
- [37] Kim SN, Jeong HS, Park SN, (2007), "Purification and immunogenicity study of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of Virological Methods*; 139: 24–30.
- [38] Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT, (1992), "Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic", *Proceedings of the National Academy of Science*; 89(24): 12180-12184.
- [39] Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare E, Sherman ME, Thomsen BL, Suntum M, Bock JE, Poll PA, Meijer CJ, (2002), "Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study", *BMJ*; 325:572.
- [40] Kohl T, Hitzeroth I, Christensen N, Rybicki E, (2007), "Expression of HPV-11 L1 protein in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*", *BMC Biotechnology*; 7: 56.
- [41] Koutsky L. (1997). "Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection", *American Journal of Medicine*; 102: 3-8.
- [42] Krawczyk E, Schlegel R, (2008), "Koilocytosis a cooperative interaction between the human papilomavirus E5 and E6 oncoproteins", *American Journal of Pathology*; 173: 682-688.
- [43] Lawson JS, Glenn WK, Heng B, Ye Y, Tran B, Lutze-Mann L, Whitaker NJ, (2009), "Koilocytes Indicate A Role For Human Papilloma Virus In Breast Cancer", *British Journal of Cancer*; 101: 1351-1356.
- [44] Liu HL, Li WS, Lei T, Zheng J, Zhang Z, Yan XF, Wang ZZ, Wang YL, Si LS, (2005), "Expression of Human papillomavirus Type 16 L1 Protein in Transgenic Tobacco Plants", *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*; 37: 153–158.
- [45] Llanos S, Cuadrado A, Serrano M, (2009), "MSK2 Inhibits p53 Activity in the Absence of Stress", *Science Signal*; 22 ;2(89): ra57

- [46] Maclean J, Koekemoer M, Oliver AJ, Hitzeroth II, Fischer R, Williamson AL, Rybicki EP, (2007) "Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization", *Journal of General Virology*; 88: 1460–1469.
- [47] Male D, Brostoff J, Roitt I, (2004), "Inmunology", 7^a ed, Mosby, USA, pp 65-85.
- [48] Margni R, (2000), "Inmunología e Inmunquímica Fundamentos", 5^a ed, Panamericana, Buenos Aires, pp 205.
- [49] Mayer G, (2009), "Inmunology Chapter 4 Inmunoglobulins structure and function", The Board of Trustees of the University of South Carolina, en línea <http://www.med.sc.edu:85/mayer/IgStruct2000.htm> microbiology and inmunology on-line
- [50] Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, (2003), "Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers", *Journal of Virology*; 77: 10186-10201.
- [51] Molina J, Guzmán Bistoni C, Méndez V, Blasco-Olaetxea E, (2005), "Alteraciones cromosómicas en el cáncer del cuello uterino", En línea
- [52] Moscicki AB, (2005), "Impact Of HPV Infection in Adolescent Populations", *Journal of Adolescent Health*; 37: 2-5.
- [53] Muller M, Gissman L, (1997), "Chimeric papillomavirus-like particles", *Virology*; 234: 93 – 111.
- [54] Muñoz N, Bosch FX, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, (2003), "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer", *The New England Journal of Medicine*; 348: 518-527.
- [55] Newall AT, Beutels P, Wood JG, Edmunds WJ, (2007), "Cost effectiveness analyses of human papillomavirus vaccination", *Lancet Infectious diseases*; 7: 289-296.
- [56] Olsson SE, Villa LL, Costa RL, Petta CA, Iversen OE, Steinwall M, Andersson-Ellstrom A, EElfgren K, von Krongh G, Paavonen J, Giacoletti K, Esser MT, Vuocolo SC, Saah AJ, Barr E, (2007), "Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine", *Vaccine*; 25: 4931–4939.
- [57] Osborne BA, Kindt T, Goldsby R, (2007), "Inmunología de Kuby", 6^a ed, Mc Graw Hill, México, pp 262.
- [58] Painsil J, Muller M, Picken M, Gissmann L, Zhou J, (1996), "Carboxyl terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation", *Virology*; 223: 238–244
- [59] Paz de la Rosa G, (2009), "Determinación de la respuesta inmune en contra de VLPs normales y quiméricas del Virus del Papiloma Humano 16 producidas en jitomate (*Solanum lycopersicum L.*) en animales de laboratorio", Tesis para doctorado, CINVESTAV.
- [60] Pinto LA, Edwards J, Castle PE, Harro CD, Lowy DR, Adelsberger JW, Baseler MW, Hildesheim A, (2003), "Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16

- L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles”, *Journal Infectious Diseases*; 188: 327–38.
- [61] Rambout L, Hopkins L, Hutton B, Fergusson D, (2007). “Prophylactic vaccination against human papillomavirus infection and disease in women: a systematic review of randomized controlled trials”, *Canadian Medical Association Journal*; 28: 469-479.
- [62] Rensing ME, Ruppert J, Sette A, Brandt RM, Wentworth PA, Oseroff C, Grey HM, Melief CJ, Kast WM, (1995), “Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides”, *Journal Immunology*; 154: 5934-5943.
- [63] Rigano MM, Alvarez ML, Walmsley AM, (2004), “Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic Escherichia coli heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in Arabidopsis thaliana”, *Plant Cell Reports*; 22: 502-508.
- [64] Rojas-Espinosa O, (2001), “Inmunología”, 2ª ed, Médica Panamericana, México, pp 30-32.
- [65] Rosen, FS y Geha RS, (2004), “Cases Studies in Inmunology”, 4ª ed, Garland Publishing, NBew York USA, pp 243.
- [66] Rouse BT y Suvas S. (2004), “Regulatory cells and infectious agents: détente cordiale and contraire”, *Journal of Immunology*; 173: 2211-2215.
- [67] Ruedl C, Schwarz K, Jegerlehner A, Storni T, Manolova V, Bachmann M, (2005), “Virus-Like Particles as Carriers for T-Cell Epitopes: Limited Inhibition of T-Cell Priming by Carrier-Specific Antibodies”, *Journal of virology*; 79: 717–724.
- [68] Schreckenberger C y Kaufmann AM, (2004), “Vaccination strategies for the treatment and prevention of cervical cancer”, *Current Opinion in Oncology*; 16: 485–491.
- [69] Shi L., G. Sanyal, D.B. Volkin, (2005), “Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 94: 1538–1551.
- [70] Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, (2004), “Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: A pooled analysis of the IARC multicentric case-control study”, *International Journal of Cancer*; 111: 431–439.
- [71] Sokolowski M, Tan W, Jellne M, (1998), “Schwartz S, mRNA instability elements in the human papillomavirus type 16 L2 coding region”, *Journal of Virology*; 72: 1504-15.
- [72] Stanley Margaret, (2005) “Immune Responses to Human Papillomavirus”, *Vaccine*; 24:S16.S22
- [73] Stites PD, Terr IA, Parslow TG, Imboden BJ, (2004), “Inmunología básica y clínica”, 9ª ed, Manual Medina, México D.F.
- [74] Streatfield SJ (2007) “Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants”, *Plant Biotechnology Journal*; 5: 2-15.
- [75] NOM-014-SSA2-1994: Sobre el control y tratamiento del cáncer cérvico-uterino, México: Secretaria de Salud, Diario Oficial de la Federación, 31 de mayo de 2007.
- [76] Superintendencia de Salud, (2009), “Patologías garantizadas AUGE”, en línea <http://www.supersalud.cl/568/propertyvalue-503.html>. (octubre, 2009.)

- [77] Tan W, Felber BK, Zolotukhin AS, Schwartz S. (1995), "Efficient expression of the human papillomavirus type 16 L1 protein in epithelial cells by using Rev and the Rev-responsive element of human immunodeficiency virus or the cis-acting transactivation element of simian retrovirus type 1", *Journal of Virology*; 69: 5607-5620.
- [78] Thomas KJ, Smith KL, (2008), "HPV-16 E626-28- Specific T cells kill cervical carcinoma cells despite partial evasion of T-cell effectors function", *International Journal of Cancer*; 122: 2791-2799.
- [79] Toledo-Guzmán M, (2010), "Análisis de la Respuesta de Linfocitos T CD8⁺ En Ratones de la Cepa C57BL/6 Inmunizados con Partículas Tipo Virales Quiméricas (cVLP) Generadas en Plantas de Jitomate", Tesis de Licenciatura, FES Zaragoza UNAM.
- [80] Varsani A, Williamson AL, Rose RC, Jaffer M, Rybicki, (2003) "Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi", *Arch Virol*; 148: 1771–1786.
- [81] VAX, (2007), "Entender a los anticuerpos neutralizantes", en línea http://gtt-vih.org/actualizate/boletin_sobre_vacunas_del_sida/vax_febrero2007/cuestiones_basicas, (marzo, 2009).
- [82] Visser JH, Nijman W, Daemen T, (2007), "Frecuencias & role of regulatory T cells in patients with pre-malignant cervical neoplasia", *Clinical & experimental Immunology*; 150: 199–209
- [83] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Snijders P, Meijer CJ, Muñoz n, (1999), "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide", *Journal of Pathology*; 189: 12-19.
- [84] Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL, Clements JD, Rose RC, (2003), "Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato", *Journal of Virology*; 77:8702-11.
- [85] Wilson VG y Rosas-Acosta G, (2003), "Molecular Targets for Papillomavirus Therapy Current", *Drug Targets-Infectious Disorders*; 3:97-113.
- [86] Xu YF, Zhang QY, Xu MX, Song XG, (2006), "Papillomavirus virus like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes", *Archives of Virology*; 151: 2133- 2148.
- [87] Yugawa T, Kiyono T, (2009), "Molecular mechanisms of cervical cercinogenesis by high- risk human papillomaviruses: novel functions of E6 y E7 oncoproteins", *Medical Virology*; 19: 97–113.
- [88] Zur Hausen H, de Villiers EM, Gissmann L, (1981), "Papillomavirus infections and human genital cancer", *Gynecol Oncology*, 12: 124–128.

ABREVIATURAS

- ☞ CaCu Cáncer Cérvico-uterino
- ☞ CPA Célula presentadora de Antígenos
- ☞ DNA ácido desoxirribonucleico
- ☞ DO Densidad Óptica
- ☞ ELISA Ensayo de Inmunabsorbancia ligado a enzimas (del inglés *enzyme linked immunosorbent assay*)
- ☞ HPV Virus del Papiloma Humano (del inglés *Human Papillomavirus*)
- ☞ HPV-AR Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo
- ☞ HPV-BR Virus del Papiloma Humano de Bajo Riesgo
- ☞ Ig Inmunoglobulina
- ☞ IgG Inmunoglobulina tipo G
- ☞ kD Kilodaltons
- ☞ LTC Linfocito T Citotóxico
- ☞ MHC del inglés *major histocompatibility complex*
- ☞ NIC Neoplasia Intraepitelial Cervical
- ☞ VLP Partícula tipo viral (del inglés *virus like particle*)
- ☞ VLPg Partícula tipo viral de L1 del HPV-16,-11, - 6 y -18 de la vacuna Gardasil®
- ☞ VLPj Partícula tipo viral de L1mut del HPV-16 producida en jitomate
- ☞ VLPq Partícula tipo viral de L1mutE6E7 del HPV-16 producida en jitomate