



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN  
CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

**Análisis de la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup>  
en ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados  
con partículas tipo virales quiméricas (cVLP)  
generadas en plantas de jitomate**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**MARIEL ESPERANZA TOLEDO GUZMÁN**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**



**MÉXICO, D. F. JUNIO 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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

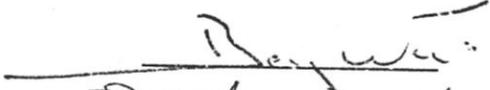
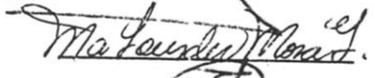
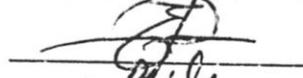
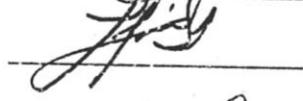
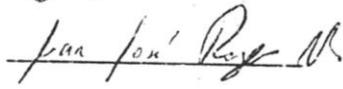
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **TOLEDO GUZMÁN MARIEL ESPERANZA**, con número de cuenta **405044526** de la carrera de Biología se le ha fijado el día **15** del mes de **JUNIO** de 2010 a las **14:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

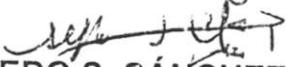
- |            |                                 |   |
|------------|---------------------------------|---|
| PRESIDENTE | DR. BENNY WEISS STEIDER         |     |
| VOCAL      | DRA. MA. DE LOURDES MORA GARCÍA |    |
| SECRETARIO | DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO    |   |
| SUPLENTE   | M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ   |  |
| SUPLENTE   | DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO |  |

El título de la tesis que presenta es: **Análisis de la respuesta de linfocitos T CD8+ en ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con partículas tipo virales quiméricas (cVLPs) generadas en plantas de jitomate.**

Opción de titulación: Tesis

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

**ATENTAMENTE** ESTUDIOS SUPERIORES  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D. F., a 13 de mayo de 2010.

  
**C.D. ALFREDO S. SÁNCHEZ FIGUEROA**  
DIRECTOR DIRECCION

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

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

---

## DEDICATORIA

A mis papás María y José Antonio por su apoyo incondicional, sus consejos y por estar siempre a mi lado, en las buenas y en las malas pero sobre todo por todo el amor que me han dado, todo lo que he logrado hasta este día y lo que venga después va a ser parte de su logro también. Los quiero.

A mi hermana Alma por ser un gran ejemplo y una gran Bióloga y por estar a mi lado desde que éramos una sola célula. Sí, te quiero Huesos.

A mis Abuelitos Adalberta†, Francisco, mis Tíos Gaby, Edmundo, por quererme como si fueran mis papás y por estar a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida. A Betty, Gaby y Liz, mis hermanitas.

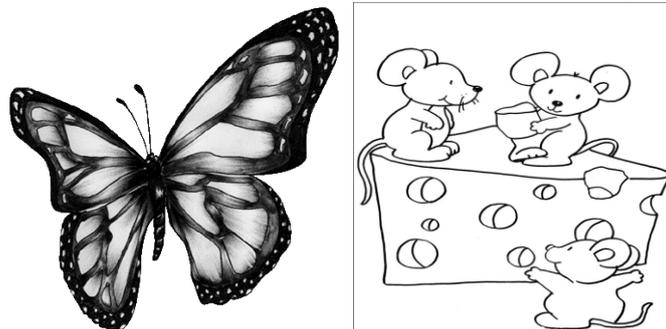
En especial a Yessica, Jesús y Recaredo por ser uno de los mejores regalos que me encontré en la Universidad, los quiero como si fueran mis hermanos, gracias por hacerme la vida más feliz, por todas las risas, corajes y lagrimas que pasamos juntos, espero tenerlos a mi lado siempre.

Gracias a mis amigos de toda la vida David, Fabiola, Gaby, Ivette, Jazmín, Lucía, María José; los quiero a todos, mil gracias por existir y por estar a mi lado en todo momento, aunque yo no haya estado siempre a su lado; quisiera tener palabras para cada uno pero no acabaría nunca, son lo más especial para mí, los quiero, los quiero mucho, mucho.

A todos mis amigos, y personas maravillosas que me he encontrado a lo largo de mi camino; los que acaban de llegar y los que ya se fueron; no los menciono a todos pero ustedes saben quiénes son.

A mis bebés hermosos Mora y Cucho† por iluminar mi vida.

Y la más especial de todas para las ratoncitas que dieron su vida para la realización de este trabajo.



**"Quién dice que no se puede vivir un sueño, si a fin de cuentas, un sueño nos alienta a vivir."**

---



## AGRADECIMIENTOS

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO CON EL APOYO DE LA BECA DEL PROYECTO DE CONACYT No. 82827

Gracias a mis compañeros de Laboratorio Arturo, Azucena, Carmen, Gina, Ivonne, Kary, Luis, Francisco, Pamela, Selene, Vianey, Mtro. Jorge, Dr. Monroy y Dra. Lulú por hacerme aún más feliz mi estancia y trabajo en el laboratorio, por sus consejos, enseñanzas, paciencia, chistes, bromas, risas y hasta regaños.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	5
1. Sistema Inmune.....	5
1.1 Inmunidad Innata.....	5
1.2 Inmunidad Adaptativa.....	6
1.3 Tipos de Respuesta Inmunitaria Adaptativa.....	7
2. Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....	8
2.1 Estructura y Función del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.....	8
2.2 Procesamiento y Presentación de Antígenos MHC I.....	10
3. CÁNCER CÉRVICOUTERINO.....	12
3.1 Desarrollo Histórico.....	12
3.2 Virus del Papiloma Humano.....	13
3.3 Tipos y Clasificación de HPVs.....	17
3.4 Factores de Riesgo.....	18
3.5 Transmisión.....	19
3.6 Epidemiología del Cáncer Cérvicouterino.....	19
3.7 Ciclo Viral.....	19
3.8 Vacunas Contra el Cáncer Cérvicouterino.....	22
4. VLPs.....	23
4.1 VLPs Quiméricas.....	24
4.2 Expresión de VLPs en Plantas.....	26
4.3 Construcción de Líneas de Jitomate TA234L1Mut HPV-16 y TA234L1Mut HPV-16E6 y E7 y Transformación de Jitomate.....	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPOTÉISIS.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	30

OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	47
C ONCLUSIONES.....	52
PERSPECTIVAS.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	54
ABREVIATURAS.....	66

## RESUMEN

La infección con virus de papiloma humano (HPV) de alto riesgo, es el factor etiológico más importante en el desarrollo de cáncer cervical (CaCu), anualmente en el mundo 500, 000 mujeres son diagnosticadas con infección por HPV y 250, 000 mueren. Actualmente se han generado vacunas profilácticas constituidas por partículas tipo virales (VLP's) conformadas por la proteína estructural L1 de los serotipos HPV-16,-18, -6 y -11 (Gardasil®) y HPV-16 y -18 (Cervarix®), cuya efectividad ha sido demostrada en la inducción de anticuerpos neutralizantes, que previenen la infección hasta un 100% en mujeres libres de la infección. No obstante, la efectividad de estas vacunas en mujeres que cursan con la infección persistente y lesiones producidas por los tipos virales incluidos en las mismas, es notablemente disminuida, lo cual hace necesario el desarrollo de vacunas de tipo terapéutico que incluyan antígenos expresados en las células infectadas, tales como aquellos derivados de las proteínas E6 y E7, los cuales son sobre-expresados en las células tumorales de CaCu. En este trabajo se evaluó la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> y el efecto terapéutico (determinado por el decremento de tamaño tumoral) producido por la administración de partículas tipo virales quiméricas (cVLPs), conformadas por la proteína L1 de HPV16 y epítopes inmunogénicos de las oncoproteínas E6 y E7, así como de partículas tipo virales (VLPs), conformadas únicamente de la proteína L1 ambas generadas en plantas de jitomate transgénico. Ratones de la cepa C57BL/6 fueron inmunizados con 3 dosis de 5µg c/u de cVLPs y VLPs, posteriormente se evaluó la actividad citotóxica de los linfocitos del bazo de estos ratones sobre células tumorales TC-1 (que expresan los antígenos E6 y E7 de HPV-16). El efecto terapéutico de estas partículas, se evaluó sobre el crecimiento tumoral inducido en ratones inoculados previamente con células TC-1. La inmunización con cVLPs y VLPs indujeron la generación de linfocitos T citotóxicos capaces de matar *in vitro* de manera eficiente a células tumorales TC-1 y TC-1/L1 (transfectadas con L1) respectivamente. Por otro lado, la administración de cVLPs en ratones con tumores inducidos, fue capaz de reducir el crecimiento tumoral en un 50% y con VLPs cerca del 20%. Estos resultados muestran la capacidad de las cVLPs (generadas en plantas de jitomate) para inducir una eficiente respuesta inmune contra células tumorales que expresan antígenos E6 y E7 de HPV-16. Lo cual puede ser de gran relevancia para el desarrollo de vacunas terapéuticas eficientes contra el CaCu.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvicouterino (CaCu) se encuentra fuertemente asociado con la infección por el virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo y es la segunda causa de muerte por neoplasia entre las mujeres alrededor del mundo con cerca de 500,000 nuevos casos y aproximadamente 300,000 muertes cada año (Días *et al* 2005; Cid, 2009). El HPV es una enfermedad de transmisión sexual que se mantiene latente por un largo periodo de tiempo, se estima que cerca del 60% de la población sexualmente activa está infectada con este virus; ello se debe a que la infección por este virus es asintomática y se mantiene latente por largos periodos, por lo que el contagio se propaga continuamente (Boshart *et al* 1986).

Se ha demostrado que las proteínas que constituyen la cápside del HPV son altamente inmunogénicas y pueden activar al sistema inmune (Frazer *et al* 2004). Dada esta característica se diseñaron vacunas que están basadas en la proteína L1, que *in vitro* tiende a ensamblarse espontáneamente en partículas tipo virales (VLPs), los cuales son semejantes a los viriones nativos en tamaño y forma, pero carecen de ADN infectante (Frazer *et al* 2004).

En los últimos años, dos vacunas recombinantes que contienen la proteína L1 del HPV; Gardasil® contra los tipos HPV de alto riesgo más comunes 16 y 18, y los tipos de bajo riesgo 6 y 11, y Cervarix® contra los tipos 16 y 18, han sido comercializadas como estrategia para la prevención de la infección con HPV. Estas vacunas han demostrado tener eficacia a través de la inducción de anticuerpos neutralizantes de la proteína L1 de la cápside (Eisntein, 2008; Gissmann, 2009). No obstante, una vacuna con fines terapéuticos es necesaria debido a que las vacunas comercializadas son incapaces de eliminar infecciones establecidas (Cid, 2009; Sterlinko, 2009; Lin *et al* 2010).

Por lo tanto, surge la necesidad de generar VLP's quiméricas con capacidad terapéutica, que contengan epítopes derivados de las proteínas oncogénicas E6 y E7, frecuentemente encontradas en las células infectadas por HPV o células tumorales de cáncer cérvico-uterino, los cuales pueden ser blancos idóneos para ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos y en su caso eliminar a las células infectadas (Lin *et al* 2010). En modelos de vacunación de ratones con VLP's híbridos de la proteína L1 de HPV/E7

HPV16 y capsómeros de L1 de HPV16, la inducción de linfocitos T citotóxicos además de anticuerpos neutralizantes hacia epítopes específicos de la proteína L1 han mostrado una efectiva protección continua hacia el reto subsecuente con viriones infecciosos y células tumorales infectadas por HPV-16 en los animales inmunizados (Xu *et al* 2006; Bian *et al* 2008).

El uso de las plantas para la producción de vacunas baratas y eficientes es una posibilidad muy atractiva que se está investigando en varios laboratorios. Recientemente, en el laboratorio del Dr. Gómez-Lim de la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV Guanajuato, se logró la expresión en plantas de jitomate TA234-L1MutE6E7HPV-16, de VLPs quiméricas (cVLPs) constituidas por la proteína L1 y epítopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 (Paz de la Rosa, 2009). En consecuencia, en el presente estudio se analiza el efecto terapéutico de las cVLPs derivadas de la planta transgénica de jitomate por medio de un modelo *in vivo* con ratones de la cepa C57BL/6, se evaluó si tras la inoculación con células tumorales TC-1, es posible la reducción del tamaño tumoral con la posterior inmunización con cVLPs. Este estudio será de gran relevancia para evidenciar el potencial terapéutico de estas cVLPs y con base en ello establecer los mecanismos celulares efectores inducidos tras la vacunación.

## MARCO TEORICO

### 1. Sistema Inmune

Las células y moléculas capaces de reconocer y eliminar a invasores extraños constituyen el sistema inmunitario, y la respuesta global coordinada a la introducción de sustancias extrañas es la respuesta inmunitaria. El sistema inmune tiene tres propiedades funcionales principales que permiten la defensa del cuerpo. La primera es su extrema especificidad, con la propiedad de reconocer y distinguir una diversidad de moléculas blanco diferentes para responder o no ante el agente agresor. La segunda, que efectúa una discriminación entre lo propio y lo extraño, y la tercera es que el sistema inmune posee una memoria con la propiedad de adaptarse a partir de experiencias previas con un agente patógeno. Aunque se hace referencia al sistema inmunitario debe señalarse que existen dos tipos diferentes de éste, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, que colaboran para proteger al organismo (Kindt *et al* 2007).

#### 1.1 Inmunidad Innata

También denominada inmunidad natural o inmunidad nativa está constituida por mecanismos existentes antes de que se desarrolle la infección, capaces de producir respuestas rápidas a los microorganismos. Los componentes principales de la inmunidad innata son: 1) barreras físicas y químicas, tales como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en superficies epiteliales; 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*); 3) proteínas sanguíneas, entre las que se incluyen miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y 4) proteínas denominadas citocinas, que regulan y coordinan muchas acciones de las células que intervienen en la inmunidad celular. Los mecanismos de la inmunidad innata son estimulados por estructuras comunes a grupos de microorganismos relacionados y pueden no distinguir diferencias sutiles entre las sustancias extrañas. La inmunidad innata representa la primera línea defensiva contra los microorganismos. La patogenicidad de

los microorganismos está relacionada en parte por su capacidad para resistir a los mecanismos de la inmunidad innata. (Regueiro *et al* 2002).

## 1.2 Inmunidad Adaptativa

En contraposición con la inmunidad innata, existen mecanismos de defensa mucho más evolucionados que son estimulados tras la exposición a agentes infecciosos, y cuya intensidad y capacidad defensiva aumentan después de cada exposición subsiguiente a un determinado microorganismo. Debido a que esta forma de inmunidad se desarrolla como una respuesta a la infección, recibe el nombre de inmunidad adaptativa. Las características de la inmunidad adaptativa son una especificidad extraordinaria para macromoléculas diferentes y su capacidad para recordar y responder con mayor intensidad tras exposiciones repetidas al mismo microorganismo. Debido a esta capacidad para discriminar entre diferentes microorganismos y macromoléculas, aunque estén estrechamente relacionados, la inmunidad adaptativa se denomina también inmunidad específica. Las sustancias extrañas que inducen respuestas inmunitarias específicas o son dianas de tales respuestas se denominan antígenos (Abbas *et al* 2007).

La respuesta inmunitaria innata y adaptativa forman parte de un sistema integrado de defensa en el huésped en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas. Existen dos vínculos importantes entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. En primer lugar, la respuesta inmunitaria innata frente a microorganismos estimula el desarrollo de respuestas inmunitarias adaptativas e influye en la naturaleza de estas respuestas. En segundo lugar, las respuestas inmunitarias adaptativas utilizan muchos de los mecanismos efectoros de la inmunidad innata para eliminar microorganismos y a menudo potencian la actividad antimicrobiana de los mecanismos de defensa de la inmunidad innata (Abbas *et al* 2007; Janeway *et al* 2001).

### 1.3 Tipos de Respuesta Inmunitaria Adaptativa

Hay dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativa, la inmunidad humoral y la inmunidad celular, las cuales están mediadas por diferentes componentes del sistema inmunitario y cuya función es eliminar diferentes tipos de microorganismos.

En la inmunidad humoral participan moléculas presentes en la sangre, denominadas anticuerpos, que son producidas por unas células llamadas linfocitos B. Los anticuerpos reconocen específicamente a antígenos microbianos, neutralizan la efectividad de los microorganismos y dirigen su acción hacia éstos para su eliminación por medio de diversos mecanismos efectores (Canaday, 2001). La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa frente a microorganismos extracelulares y sus toxinas debido a que los anticuerpos secretados pueden unirse a estos microorganismos y toxinas para facilitar su eliminación por medio de activación de proteínas del complemento, neutralización y opsonización de microorganismos (Castellanos, 2001).

En la inmunidad celular, también llamada inmunidad mediada por células, participan células llamadas linfocitos T. Los microorganismos intracelulares, tales como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular, que induce la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o de las células infectadas (Janeway *et al* 2001).

Los linfocitos T se pueden distinguir entre sí por la función que llevan a cabo, y por dos proteínas de superficie conocidas como CD4 y CD8, los linfocitos maduros expresan casi siempre una de las dos proteínas y ésta se relaciona con su función celular y con el tipo de proteína del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) que reconocen. El 70% de las células T son CD4<sup>+</sup>, el 25% son CD8<sup>+</sup> y cerca del 4% son CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> y, el 1% pueden ser doble positivos (Regueiro *et al*, 2002). Los linfocitos T cooperadores (Th) o CD4<sup>+</sup>, reconocen péptidos presentados por moléculas del MHC II, este reconocimiento es el estímulo inicial para su activación, además secretan citocinas que promueven diferenciación y proliferación de otras células T y B, siendo el principal de estos

factores la interleucina 2 (IL-2) (Canaday *et al* 2001). Dentro de las células Th pueden distinguirse dos grupos: Th1 secretan IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$  e TNF- $\beta$  y las Th2 que secretan IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 y GM-CSF (Passmore, 2002).

Diferentes estudios han demostrado que las células tumorales y células infectadas con virus pueden ser destruidas por los linfocitos T citotóxicos, es decir, que tienen la capacidad de destruir células extrañas (Canaday *et al* 2001). Los linfocitos T citotóxicos presentan en su superficie moléculas CD8<sup>+</sup> y reconocen sólo porciones o péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC I. El linfocito T citotóxico activado produce gránulos citolíticos constituidos por enzimas proteolíticas (granzimas, perforinas) para destruir a las células blanco, por lo que los linfocitos T citotóxicos (Tc) o CD8<sup>+</sup> han sido usados por muchos años como las mejores células efectoras contra el crecimiento de tumores y se ha sugerido el uso de epítopes antigénicos a CD8<sup>+</sup> en las vacunas tumorales para inducir una respuesta efectiva, específica en la respuesta inmune celular (Castellanos, 2001).

## 2. Complejo Mayor de Histocompatibilidad

La tarea de mostrar los antígenos de los microorganismos asociados a células para su reconocimiento por las células T es realizada por proteínas especializadas codificadas por genes situados en un locus denominado complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés major histocompatibility complex). Su función fisiológica es la presentación de péptidos a las células T. Así, las moléculas del MHC son parte integral de los ligandos que reconocen la mayoría de las células T, ya que los receptores de antígenos de las células T realmente son específicos para los complejos de antígenos peptídicos extraños y moléculas del MHC propias (Roitt *et al* 2003).

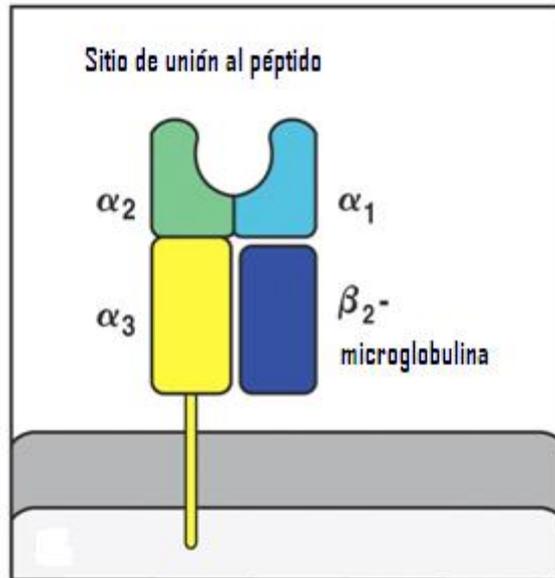
### 2.1 Estructura y función del Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Hay dos tipos diferentes de productos de genes del MHC, las moléculas de clase I (antígenos extracelulares que han sufrido endocitosis y antígenos extracelulares citosólicos) y las moléculas de clase II, (antígenos extracelulares) (Kindt *et al* 2007). En

los seres humanos las moléculas del MHC reciben el nombre de antígenos leucocitarios humanos, (HLA del inglés human leukocyte antigens) y equivalen a las moléculas H-2 del ratón. Estas proteínas actúan como marcadores inmunogénicos que distinguen a las células de cada persona y constituyen la principal barrera de la histocompatibilidad. Las moléculas del MHC están asociadas a la membrana celular de las células presentadoras de antígeno (Janeway *et al* 2001).

La molécula de clase I está constituida por dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente. La cadena  $\alpha$  ó cadena pesada, codificada por los genes de clase I del MHC y una cadena no codificada por el MHC, la  $\beta$ 2 -microglobulina o cadena liviana, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 15 (**Figura 1**).

La cadena  $\alpha$  posee tres segmentos que se numeran desde el extremo N-terminal,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, y  $\alpha$ 3. Los segmentos  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 interactúan separados por un segmento en lámina plegada  $\beta$  para formar el sitio de unión al péptido. Este espacio creado es lo suficientemente grande para que se una a péptidos entre 8 a 11 aminoácidos. El segmento  $\alpha$ 3 se pliega para formar un dominio tipo Ig, este segmento contiene un bucle que sirve de unión a la molécula CD8<sup>+</sup>.



**Figura 1.** Estructura del complejo mayor de histocompatibilidad clase I. (Kenneth *et al* 2008).

Las moléculas de clase II del MHC está compuesta por dos cadenas asociadas de modo no covalente, la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$ , a diferencia de las moléculas de clase I, son sintetizadas por genes del MHC.

## 2.2 Procesamiento y Presentación de Antígenos MHC I

Todas las células nucleadas pueden presentar péptidos asociados a moléculas de clase I, derivados de antígenos producidos mediante la degradación proteolítica de proteínas citosólicas, a linfocitos T  $CD8^+$  debido a que todas las células nucleadas expresan moléculas MHC I. Las vías de procesamiento y presentación de antígenos por moléculas de clase I son útiles para la defensa frente a virus, bacterias intracelulares y células tumorales. Estos péptidos son producidos por degradación citosólica, luego transportadas al retículo endoplásmico donde se unen a las moléculas de clase I en formación y finalmente se expresan en la membrana (Janeway *et al* 2001) (**Figura 2**).

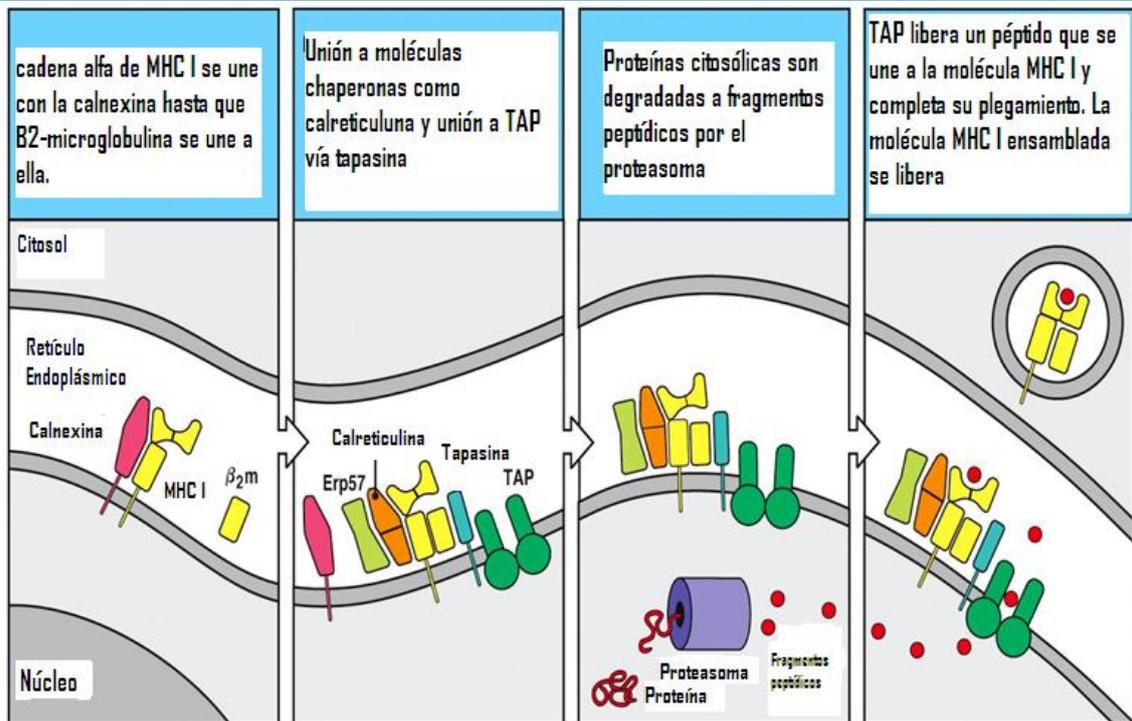


Figure 5-6 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

**Figura 2.** Vía de presentación de antígenos asociada al MHC de clase I (Kenneth *et al* 2008).

El proteasoma es un extenso complejo enzimático multiprotéico que posee una amplia gama de actividad proteolítica y que está presente en el citoplasma de la mayoría de las células. El proteasoma lleva a cabo una función básica de control de las células mediante la degradación de numerosas proteínas citoplasmáticas distintas. Las proteínas se convierten en objetivos de la degradación proteasómica mediante la unión covalente de varias copias de un pequeño polipéptido denominado ubiquitina. Luego de la ubiquitinización, las proteínas se despliegan e ingresan al proteasoma, quien las degrada a pequeños péptidos capaces de interactuar con las moléculas del MHC I (Janeway *et al* 2001).

### 3. CÁNCER CÉRVICOUTERINO

Se ha estimado que entre el 20-21% de los casos de incidencia de cáncer a nivel mundial pueden estar ligados a infecciones (Zur Hausen, 2009). Esto no incluye solo infecciones virales (por ejemplo, el virus de Epstein-Barr, virus de herpes humano tipo 8, tipos de alto riesgo de HPV, virus de hepatitis B y C, retrovirus humano T-linfotrópico), si no también bacterianas (*Helicobacter pylori*) e infecciones parasitarias (*Schistosoma haematobium*, *Opisthorchis viverenni*, *Clonorchis sinensis*) (Zur Hausen, 2008). Entre estas infecciones ligadas a algún tipo de cáncer humano, en hombres *H. pylori* emerge como el de mayor contribución, con cerca del 47% principalmente debido a la alta frecuencia de cáncer gástrico. En mujeres, la situación difiere substancialmente, donde *H. pylori* ocupa sólo el 26% de las infecciones ligadas a carcinomas. Aquí las infecciones por virus del papiloma humano (HPV, de sus siglas en inglés, Human Papilloma Virus) juegan por mucho el papel más dominante, contribuyendo con más del 51% de los casos de cáncer en mujeres, a diferencia de los hombres en los cuales el HPV es responsable de solo el 4% de la infección ligada a casos de cáncer (Zur Hausen, 2009).

#### 3.1 Desarrollo Histórico

La infección natural de verrugas fue descrita inicialmente en 1907 (Ciuffo, 1907). Primero la relación entre las lesiones papilomatosas y el cáncer fue reportada como una rara enfermedad hereditaria, epidermodysplasia verruciformis, en 1922 (Lewandowsky, 1922); la contribución de las infecciones de papilomavirus como causa de estas lesiones fue comprobada mucho después (Jablonska, 1957; Orth *et al* 1978). Desde 1978 el cáncer cervical fue ligado a las infecciones por el virus Herpes simplex (HSV) tipo 2 (Zur Hausen, 2006). Sin embargo, en las biopsias de cáncer no se pudo encontrar DNA de HSV-2, entonces comenzaron a buscarse otros agentes involucrados en este cáncer cuya epidemiología sugiere que están involucrados factores de transmisión sexual. Así fue como se empezó en 1972 a realizar estudios experimentales para analizar una posible incidencia del virus del papiloma humano en esta enfermedad. Desde el punto de vista de algunos reportes que indican la rara

conversión de verrugas genitales a tumores malignos, el virus supuestamente presente en verrugas genitales pareció ser el primer candidato. Esto fue hipotetizado en varias publicaciones (Zur Hausen, 1974; Zur Hausen, 1977). En la década de los 70's dos grupos de forma casi simultánea establecieron la pluralidad de la familia de HPV (Gissmann, 1977; Orth, 1977) que contenía más de 100 miembros bien caracterizados. Entre 1982 y 1989, se publicó el aislamiento y caracterización de dos DNAs de HPV de verrugas genitales de papilomas laríngeos (De Villiers, 1981). Estudios subsecuentes hechos en laboratorios demostraron que el DNA de los tipos 16 y 18 se encontraba en aproximadamente el 70% de las biopsias analizadas. Además, un gran número de tipos fue encontrado después en algunas muestras biopsias cuidadosamente analizadas. Principalmente DNA de HPV-16, pero también HPV-18, HPV-31 y HPV-33 (Zur Hausen, 2000).

Actualmente se sabe que el virus del papiloma humano (HPV) es el principal factor etiológico en los carcinomas del tracto anogenital, incluyendo el cáncer cervical, ya que aproximadamente el 99.7% de los casos se asocian a la infección por este virus. Además se relaciona causalmente con el 90% de los cánceres anales y con el 40% de los cánceres de vulva y pene (Parkin, 2006). El cáncer cervical es la segunda enfermedad maligna más común en mujeres alrededor del mundo, y 493,000 nuevos casos de cáncer cervical se detectan cada año aproximadamente, lo que resultan casi 300,000 muertes (Bosch, 2002; Cid, 2009). Cerca del 80% de estos casos son detectados en mujeres que viven en países en vías de desarrollo, y se espera que este porcentaje se incremente al 90% para el 2020 (Parkin, 2006; Bian *et al* 2008; Zur Hausen, 2009).

### 3.2 Virus del Papiloma Humano

Los papilomavirus son pequeños virus de tamaño de 50 nm no encapsulados, con una estructura icosaédrica compuesta por 72 capsómeros formados mayoritariamente por la proteína L1 y una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular de 7500 a 8000 pares de bases. Aunque su estructura es similar a la de los poliomavirus, han sido erróneamente clasificados dentro de la familia *Papovaviridae*. Ambos géneros son

funcionalmente distintos y por ello se han dividido en dos familias diferentes. El virus del papiloma humano, comprende un gran subgrupo con más de 129 tipos clasificados por homología genómica (Coggin *et al* 1979, de Villiers *et al* 2004), algunos de los cuales tienen potencial carcinogénico y otros causan usualmente lesiones epiteliales no malignas.

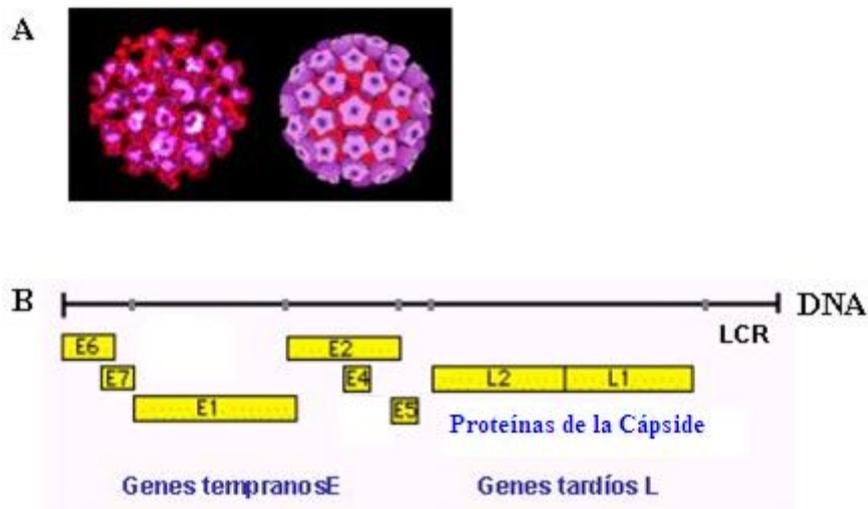
Estos virus infectan epitelios de aves y mamíferos como los que infectan vacas (BPV), perros (COPV), pinzones (ChPV), conejos (CRPV), venados (DPV), elefantes (EPV), caballos (EqPV), alces (EEPV), renos (RePV), ratones (MnPV), chimpancés (RMPV), ovejas (SPV) y humanos (HPV) (Murphy *et al.*, 1995). Usualmente, el resultado de la infección es la formación de un crecimiento benigno, verruga, o papiloma, ubicado en cualquier lugar del cuerpo. Al menos 58 tipos de HPV han sido identificados usando técnicas moleculares, estableciendo su relación con tipos particulares de tumores, (Fazel *et al* 1999). La replicación de los virus del papiloma depende del grado de diferenciación de los queratinocitos; las partículas virales maduras sólo se detectan en los núcleos de los estratos granuloso y córneo. El HPV, a diferencia de otros virus, no crece en cultivos celulares de una manera que permita la realización de ensayos antivirales adecuados. Por otro lado, en contraste a los herpesvirus que codifican 72 proteínas virales, el HPV codifica sólo 8 tipos de proteínas, carecen de proteasas, ADN polimerasa, o de enzimas involucradas en el metabolismo de los nucleótidos (Muñoz *et al* 2004).

La organización del genoma (**Figura 3**), es la misma para los diferentes tipos de HPV y consiste en tres regiones:

E (early-temprana): contiene genes para la codificación de proteínas reguladoras, transformadoras y replicadoras.

L (late-tardía): contiene genes para la codificación de proteínas estructurales de la cápside.

La LCR (del inglés: long control region; región larga de control): contiene secuencias promotoras y aumentadoras de la transcripción, así como secuencias que controlan el inicio de la replicación (Zur Hausen, 2000).



**Figura 3.** A: estructura de los viriones de HPV; B: genoma de HPV. Tomado de <http://www.medwave.cl/ciencia/15.act>

A las proteínas E se les designa como E1, E2, E4, E5, E6 y E7 y se pueden detectar en las áreas proliferativas del epitelio infectado y controlan la replicación y expresión génica viral, incluyendo las propiedades oncogénicas. Por otro lado los genes L de los cuales existen dos: L1 y L2, se encargan de codificar en forma tardía y conforman las proteínas estructurales del virus y se expresan solamente en los sectores diferenciados del epitelio (capas más superficiales) (Zur Hausen, 2002). (**Tabla 1**).

FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE HPV

PROTEÍNAS VIRALES	FUNCIONES
TEMPRANAS	
E1	Replicación del ADN viral y mantenimiento episomal.
E2	Transcripción viral, replicación y transformación.
E4	Modifica el citoesqueleto para permitir la liberación del virus.
E5	Proteína transformante, interactúa con receptores de factores de crecimiento.
E6	Proteína transformante que inactiva la proteína p53 e inhibe la apoptosis.
E7	Proteína transformante que interfiere con Rb y reactiva la síntesis de ADN del huésped.
TARDÍAS	
L1 y L2	Principales proteínas de la cápside: L1 constituye el 80% y L2 el 20%.

**Tabla 1.** Función de las proteínas del HPV (Zur Hausen, 2000)

Las proteínas virales tempranas o no estructurales codificadas por los genes E no forman parte de la estructura de la partícula viral, se sintetizan tempranamente durante la replicación viral y poseen funciones relacionadas con este proceso y con la capacidad de transformación celular. Las proteínas tardías o estructurales son codificadas por los genes L y son las que forman parte de la estructura viral.

### 3.3 Tipos y Clasificación de HPVs.

La clasificación vigente del HPV se basa en forma exclusiva en la caracterización del genoma; se considera que se trata de un nuevo tipo si la región L1 (la parte menos variable del genoma del HPV) presenta una homología menor de 90% con otros tipos conocidos de HPV. Cuando la homología se sitúa en el rango de 90 a 98%, se considera que es una variante. Los tipos designados por números y los subtipos con letras, siguiendo un orden cronológico con respecto a su descripción. De esta manera han sido identificados más de 130 tipos, aunque sólo unos 89 han sido completamente caracterizados (Beutner, 1997). Estas variaciones confieren a los diferentes tipos, subtipos y variantes de HPV diferente capacidad antigénica y diferente potencial oncogénico (Brady *et al* 1999).

Los tipos virales de HPV se clasifican en grupos de bajo, intermedio y alto riesgo, de acuerdo a la frecuencia con que se encuentren asociados a lesiones premalignas o cáncer invasor. Los tipos virales de HPV-16 y HPV-18 son considerados tipos de ALTO RIESGO ya que son comúnmente detectados en lesiones displásicas severas y cáncer invasor de cérvix (Picconi *et al* 2000) así como otros tipos de cáncer como de vulva, pene, ano y orofaringe (García-Sicilia, 2006; Muñoz, 2006). Los tipos virales como el HPV-6 y HPV-11 entre otros son denominados de BAJO RIESGO por hallarse principalmente asociados a condilomas (verrugas genitales), las displasias leves y la papilomatosis laríngea recurrente (**Tabla 2**), (Zur Hausen, 2000).

#### CLASIFICACIÓN HPV

TIPO DE HPV	RIESGO ONCOGÉNICO
16, 18, 45, 56	ALTO RIESGO
31, 33, 35, 51, 52	RIESGO INTERMEDIO
6, 11, 34, 42, 43, 44	BAJO RIESGO

**Tabla 2.** Algunos tipos de HPV y su clasificación de acuerdo al riesgo oncogénico que representan (Picconi *et al* 2000; Zur Hausen, 2000).

Según la Organización Panamericana de la Salud, el tipo 16 es el factor viral oncogénico de alto riesgo más prevalente para el cáncer cervical, ya que es responsable del 50-60% de los casos de cáncer cervical que ocurren en el mundo (Clifford *et al* 2003; Zur Hausen, 2006). También se ha identificado que los tipos 18, 45, 58, 33 y 31 son dominantes en América Latina (Muñoz *et al* 2004).

Además los HPV's se pueden clasificar de acuerdo al tipo de lesión que provoca así como el lugar donde los diferentes tipos son capaces de infectar como en la piel, lo que puede provocar tumores de cabeza, cuello y el área anogenital. En la mayoría de estas lesiones se ha confirmado la etiología viral mediante estudios citológicos e histológicos (Kurman *et al* 1998). El HPV-5 y HPV-8 están comúnmente asociados con epidermodisplasias que pueden progresar a cáncer de piel (Howley, 2001).

### 3.4 Factores de Riesgo

La edad de comienzo de las relaciones sexuales y la actividad sexual constituyen los dos factores de riesgo más importantes para la adquisición del virus del papiloma humano (Kahn *et al*, 2002; Vidart, 2007). Cuanto más precoz sea el inicio de las relaciones, mayor probabilidad de infección tienen las mujeres. Teniendo en cuenta que el HPV tiene especial atracción por las células cilíndricas de la capa basal de los epitelios, los cambios metaplásicos que aparecen de forma natural en la adolescencia en estas capas, son un terreno idóneo para su adquisición, sobre todo, en la zona de cuello del útero. En cuanto a la actividad sexual, tiene especial importancia, el número de compañeros (Kahn *et al*, 2002; Vidart, 2007). Otros factores que pueden influir en la adquisición y persistencia son:

El tabaco, que parece aumentar la inmunosupresión local, presentando en las fumadoras el doble de riesgo (Vidart *et al* 2007; Plummer *et al* 2003; Castellsage *et al* 2003). La paridad, cuantos más hijos y en edades más tempranas, más riesgo, por debajo de los 20 años el riesgo es aún mayor (se multiplica por tres (Castellsage *et al*, 2003)). El uso de anticonceptivos hormonales durante más de 5 años así como la coinfección con virus de herpes simple, clamidias y otras enfermedades de transmisión sexual, aumentan el riesgo. Alteraciones inmunológicas como son la inmunosupresión

y el HIV (virus de inmunodeficiencia adquirida, de sus siglas en inglés) facilitan la infección por HPV. La dieta, una alimentación rica en folatos, retinol, y vitaminas como la E parece ser protectora contra la infección por HPV (Trottier *et al* 2006, Muñoz *et al* 2006).

### 3.5 Transmisión

La infección por HPV se considera una enfermedad de transmisión sexual. El varón actúa como portador y suele tener lesiones subclínicas. El preservativo no protege totalmente aunque sirve para prevenir las coinfecciones que incrementan el riesgo y la aparición de otras lesiones producidas por el virus, los condilomas acuminados (protección 60-70%) (Winer *et al* 2006, Lancey *et al* 2006). Se ha observado que en los tres primeros meses del comienzo de las relaciones sexuales, más de un 50% de las adolescentes pueden adquirir al menos un tipo de HPV, viéndose en la literatura que en las adolescentes sexualmente activas hay una tasa de prevalencia de un 28.5% en el primer año, llegando hasta el 50% en los tres primeros años (Winer *et al* 2006).

### 3.6 Epidemiología del Cáncer Cérvicouterino

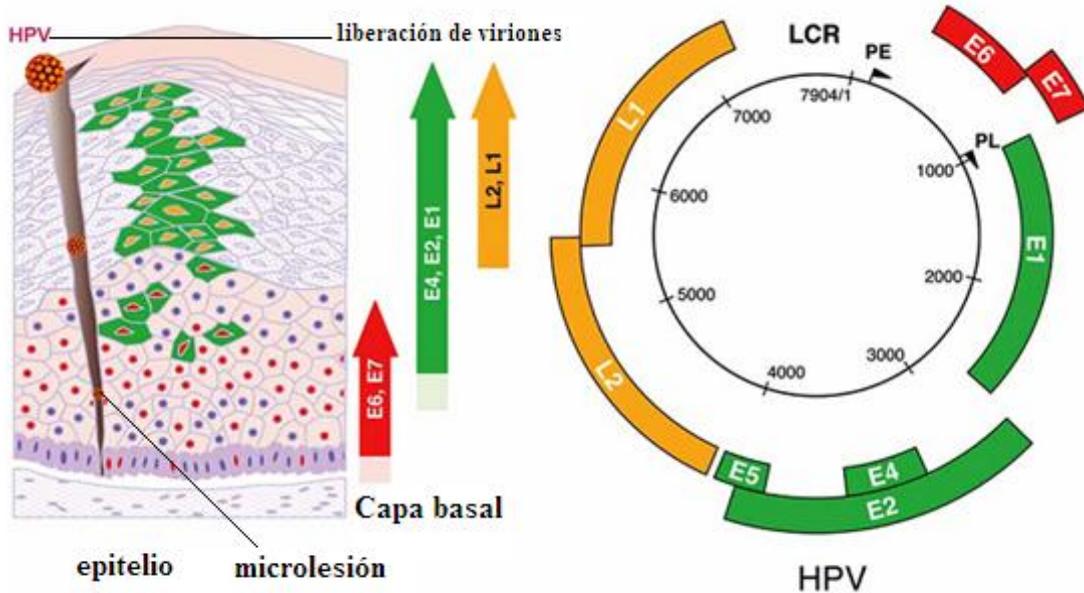
Los primeros estudios epidemiológicos acerca del cáncer cérvicouterino fueron conducidos por Rigoni en 1842, quien encontró que la incidencia de esta patología era mayor en mujeres casadas y viudas, que entre mujeres solteras, lo que determinó un primer indicio de que el comportamiento sexual jugaba un papel importante como factor de riesgo para esta enfermedad (Muñoz *et al* 2004). Actualmente el cáncer cérvicouterino continúa siendo un problema de salud pública, posesionándose a nivel mundial como el segundo cáncer más común en mujeres después del cáncer de seno con cerca de medio millón de casos nuevos al año y alrededor de 300, 000 muertes (Kahn, 2009).

### 3.7 Ciclo Viral

El ciclo viral de todos los tipos del papiloma humano es regulado por el estado de diferenciación de la célula hospedera, el queratinocito. La infección se inicia en células madre o células de amplificación transitoria de la capa basal del epitelio que se vuelve

susceptible a la infección a través de micro lesiones. En la entrada, el DNA viral se establece en el núcleo como elementos extra cromosomales, y el promotor temprano es activado. Como resultado de un incremento de la expresión de proteínas de replicación E1 y E2, los genomas virales son rápidamente amplificados de 50 a 100 copias episomales por célula. Tras esta fase inicial de establecimiento, el número de copias, el DNA es distribuido entre ambas células hijas, posteriormente se mantiene constante, y la replicación ocurre en sincronía con la del DNA celular. Mientras las células infectadas con HPV se dividen, una célula hija migra lejos de la capa basal y provee un repertorio de DNA viral a otra célula que posteriormente se dividirá (Mao, 2006).

La otra célula hija que se mantiene en la capa basal provee un reservorio continuo de células indiferenciadas con el DNA viral en estado latente. Dado que la producción de virus del papiloma humano es limitado en las células suprabasales, es la razón por lo cual continúan proliferando (**Figura 4**). Esta dependencia en la proliferación permite a la célula infectada persistir en las capas basales por periodos muy prolongados, hasta años (Stubenrauch, 1999; Laiminis, 1998). Cuando las células infectadas con HPV se diferencian, el promotor tardío es activado y la fase productiva del ciclo viral se dispara, lo que lleva a la amplificación del DNA viral en cientos de copias, se expresan los genes tardíos y se ensamblan los viriones. (**Figura 4**). En un epitelio normal, las células de desarrollo transitorio se dividen, dando origen a células hijas que salen del ciclo celular. Las células infectadas con HPV experimentan una última fase S en la diferenciación suprabasal. Las células replican el genoma del HPV en grandes cantidades antes de empaquetarse nuevamente en la cápside. En los tipos de HPV de alto riesgo, el bloqueo en la salida del ciclo celular y la inducción de la fase S en la célula suprabasal son mediadas por las proteínas E6 y E7 (Fawett, 1999). Principalmente a través de las actividades de estas proteínas E6 y E7, el HPV altera la regulación del ciclo celular y mantiene un subconjunto de células infectadas activas en el ciclo celular, asegurando la expresión de factores celulares necesarios para la replicación del DNA viral (Chong *et al* 1991).



**Figura 4.** Ciclo viral y de infección por VPH (Frazer, 2009)

La expresión de E6 y E7 también es necesaria para facilitar la permanencia estable de elementos extra cromosomales. El riesgo de estas dos proteínas es que ambas son multifuncionales e interactúan con muchas proteínas celulares, y su papel como oncoproteínas está bien caracterizado (Thomas *et al* 1999). Las proteínas E7 de HPV de alto y bajo riesgo son proteínas nucleares que consisten en cerca de 100 aminoácidos divididos en tres regiones conservadas: un dominio amino terminal (CR1), un dominio central que contiene LXCXE con sitio de unión para pRb (CR2) y un dominio carboxi terminal que contiene dos motivos de zinc tipo dedos (CR3) (Gage *et al* 1990; Phelps *et al* 1988). La habilidad de E7 de unirse y degradar miembros de la familia Rb es una importante función de las proteínas de alto riesgo. Las proteínas E7 de bajo riesgo también se unen a pRb pero con una afinidad reducida (Munger *et al* 1989). Los miembros de la familia Rb (pRb, p107, p130) son instrumentos en el control de la progresión del ciclo celular principalmente a través de la regulación de la familia de factores de transcripción E2F (Dyson *et al* 1989; Dyson, 1998; Nevins, 1992). E7 se une a Rb fosforilándola, dando como resultado la liberación de factores E2F que son necesarios para la transcripción de genes involucrados en la proliferación y progresión del ciclo celular. Lo que permite que el ciclo celular avance de G1 a S, G2 y M. En condiciones normales, en la fase M la pRb se desfosforila por acción de una fosfatasa;

entonces, la proteína pRB puede unirse nuevamente a E2F y bloquear el ciclo celular en G1. Después del rompimiento del control del ciclo celular, las células epiteliales proliferantes, disminuyen los marcadores de diferenciación y son blancos de alteraciones genéticas adicionales por convertirse en células neoplásicas (Stubenrauch *et al* 1999). Las interacciones de E7 con Rb no parecen ser tan importantes para el mantenimiento de episomas estables así como otras interacciones.

La mejor caracterización de la actividad de E6 es su habilidad de unirse y mejorar la degradación de p53 (proteína supresora del tumor) lo que da como consecuencia la inactivación de esta proteína a través de la ubiquitinación por el mecanismo del proteasoma (Scheffner *et al* 1990; Werness *et al* 1990). Esto resulta en una habilidad reducida por parte de la célula del hospedero para comprometer los puntos de control del ciclo celular y respuestas apoptóticas. De cualquier modo, las proteínas E6 de alto y bajo riesgo han mostrado perturbar la transactivación potencial de p53. La abrogación de la actividad transcripcional de p53 puede ser lograda por la interferencia con la unión de p53 a los sitios de reconocimiento de su DNA (Galloway *et al* 1996). E6 también presenta una activa función de tolerancia.

Se ha demostrado que tanto E6 como E7 son capaces de modular vías pro y anti apoptóticas, dependiendo del tipo celular y condiciones experimentales (Finzer *et al* 2002, Garnett *et al* 2006).

### 3.8 Vacunas contra el Cáncer Cérvicouterino

La vacunación es la forma más efectiva de prevenir enfermedades infecciosas, sin embargo, la mayoría de las vacunas se han desarrollado de manera empírica con relativamente un bajo entendimiento de los mecanismos inmunitarios que medían su eficacia (Stanley *et al* 2008).

Las vacunas profilácticas tienen como objetivos prevenir el cáncer de cuello y las lesiones precancerosas, con la consiguiente disminución de la mortalidad, y la disminución de los costos por la infección (DCSC, 2007).

Las vacunas contra el HPV se han conseguido por medio de la ingeniería genética, mediante recombinación, obteniéndose la síntesis de la proteína de la cápside L1 que se ensambla, formando una partícula tipo viral (virus-like) de cápside vacía, induciendo la respuesta inmunitaria y la formación de anticuerpos neutralizantes por simulación de la morfología del virus. Hay dos vacunas en el mercado; Gardasil® (aprobada por la EMEA en 2006), y sintetizada en *Saccharomyces cerevisiae* (EMEA, 2006; Villa *et al* 2005) y Cervarix® producida por el sistema de baculovirus en *Spodoptera frugiperda* Sf-9 y *Trichoplusia ni* Hi-5 en células de insecto. (Aprobada por la EMEA en 2007), (EMEA, 2007; Harper *et al* 2004).

Éstas vacunas tienen buena tolerancia y pocos efectos secundarios. El rango de edad para su administración se sitúa entre los nueve y 26 años, aunque lo ideal es previo al inicio de las relaciones sexuales (Martinón *et al* 2006). Los resultados de protección frente al HPV, en este momento, son del 100% tanto para 16 y 18 (Gardasil® y Cervarix®) como para el 6 y 11 (Gardasil®). Sin embargo éstas no son vacunas curativas, lo que conlleva a que si la paciente que recibe la vacuna ya está infectada por algún tipo de los virus; ésta no hará que desaparezca, pero si evitará el contagio por el resto de los tipos. Por este motivo se ha planteado la administración de la vacuna previa al contacto. (EMEA, 2006; EMEA, 2007). Se deben administrar las tres dosis según el esquema de cada vacuna en ficha técnica dado que aún no hay resultados concluyentes de lo que ocurre con sólo dos dosis. Según la EMEA (European Medicines Agency) se recomienda las tres dosis dentro del primer año, pero si se interrumpe no es necesario volver a iniciar la vacunación.

#### 4. VLPs

Las partículas tipo virales (VLPs de sus siglas en inglés Virus Like Particles), son esferas altamente organizadas que se autoensamblan de estructuras antigénicas derivadas de virus. Estas partículas subvirales estables y versátiles poseen excelentes propiedades adyuvantes capaces de inducir una respuesta inmune innata. Las vacunas comercializadas basadas en VLPs han sido exitosas al proteger a los humanos de la infección de virus como el de la hepatitis B (HBV) y el HPV y actualmente es estudiado

su potencial de combatir otras infecciones y enfermedades como el cáncer. Estas VLPs se hacen a partir de proteínas de la cápside de los virus blanco o de secuencias peptídicas identificadas como partes inmunogénicas ideales para inducir una buena respuesta (Ludwing *et al* 2007).

Los virus son vehículos de 15-400nm de tamaño que envuelven su información genética con una capa formada principalmente de proteína y, a veces rodeada por una bicapa lipídica derivada de la membrana celular de la célula hospedera. Estas VLPs representan cáscaras virales vacías y sin embargo son capaces de inducir respuestas inmunes. Según la naturaleza de estas partículas, las VLPs proveen una ventaja inherente sobre antígenos solubles que han mostrado no ser efectivos en muchas vacunas propuestas debido a que son débilmente inmunogénicas o inestables. Debido a que las VLPs no son infecciosas ni se replican, también representan la alternativa más segura para atenuar virus. (Ludwing *et al* 2007).

Estas partículas están formadas principalmente por la proteína L1 del HPV, que como ya se mencionó son similares a partículas tipo virales vacías formadas durante la replicación del HPV, aunque las partículas naturales también contienen a la proteína L2. Las vacunas recombinantes contra el HPV, están basadas en L1 (Grgacic *et al* 2006). Esto es porque las vacunas profilácticas están dirigidas a proteínas tempranas de la cápside del virus, ya que son antígenos ideales en etapas tempranas de infección, por esta razón, es importante utilizar proteínas tardías como antígenos en vacunas con fines terapéuticos, ya que son blancos ideales para una respuesta contra el virus en el caso de infecciones más avanzadas (Kaufmann *et al* 2007).

#### 4. 1 VLPs quiméricas

En otros casos las VLPs han sido estudiadas como plataformas para la presentación de epítopes extraños y moléculas blanco en las VLPs quiméricas (cVLPs). Esto puede lograrse a través de modificaciones en las secuencias de las VLPs, de tal manera que las proteínas de las VLPs se fusionan con las proteínas ajenas y se unen durante una nueva síntesis (Biemelt *et al* 2003). Las VLPs quiméricas proveen un medio para la incorporación de antígenos heterólogos, incluyendo antígenos que son incapaces de

autoensamblarse en partículas (como los epítopes CTL y fragmentos de proteínas), y antígenos de virus donde la partícula viral intacta pueda no tener una inmunogenicidad óptima (como HIV) (Zur Hausen, 2002; Ludwing *et al* 2007). Las VLPs quiméricas pueden consistir en VLPs homólogas ensambladas con la fusión de epítopes de otro o de múltiples cepas de virus o epítopes adicionales al núcleo de la estructura de la VLP. La construcción de las VLPs puede estar influenciada por el hecho de que sean para hacer vacunas profilácticas o terapéuticas, ya que éstas últimas requieren de la inclusión de epítopes específicos para las células T CTL. La efectividad de las VLPs como vacunas terapéuticas puede ser asistida por adyuvantes. Las VLPs quiméricas ofrecen un enorme potencial selectivo debido a la presentación de epítopes múltiples, pero su éxito depende de una clara comprensión de la correlación de la inmunidad ya sea la protección o la aniquilación, incluyendo la selección de los epítopes más relevantes para la eficacia de la vacuna (Grgacic *et al* 2006).

Con el objetivo de aumentar el número de blancos inmunogénicos contra el HPV de alto riesgo se han construido quimeras fusionando secuencias antigénicas en los extremos C- terminal, en el C-terminal truncado o reemplazando secuencias de las proteínas estructurales L1 o L2. Así, se ha fusionado la secuencia completa o parcial de E7 del HPV-16 a proteínas estructurales (Freyschmidt *et al* 2004; Muller *et al* 1997).

Recientemente se publicaron los resultados del primer estudio clínico del uso de cVLP para el tratamiento de pacientes infectadas con HPV-16 presentando NIC2/3 de alto grado (Kaufmann *et al* 2007). En este trabajo probaron una quimera expresada en baculovirus, constituida por L1 del HPV-16 truncada en el extremo carboxilo terminal, a la cual se añadieron los residuos 1-55 de E7 de HPV-16 en el extremo amino terminal. El tratamiento consistió de 2 dosis parenterales de 75 o 250 µg en pacientes voluntarias a las que se les evaluó la reducción del tamaño de sus lesiones, reducción en el grado de NIC y la pérdida de DNA viral. La vacunación resultó en un aumento en la concentración de anticuerpos contra L1 de hasta 100 veces más altos que los títulos normales del grupo placebo. También se observó estimulación de respuesta inmune celular contra las dos proteínas. Este tratamiento resultó seguro y marca la pauta para la generación de otras estrategias en cuanto al diseño y desarrollo cVLP.

#### 4.2 Expresión de VLPs en plantas

Las plantas como el tabaco, la papa y el jitomate ofrecen un método eficiente y barato para la producción de VLPs debido a que estas VLPs producidas en plantas han mostrado ser altamente inmunogénicas en diversos estudios que se han realizado por ejemplo; en ratones se probó la ingestión oral de VLPs que contienen materia de plantas con resultados prometedores (Huang *et al* 2005).

Se ha estudiado el uso de las plantas para la expresión de antígenos vacunales con el objetivo de desarrollar material proveniente de plantas procesado mínimamente por ingestión (Mason *et al* 2002).

Aprovechando las bondades de las plantas como sistemas de expresión, varios grupos han expresado antígenos del HPV en tejido vegetal con la finalidad de usar el material transgénico para realizar pruebas inmunológicas en contra de una infección de este virus. Se logró expresar de forma transitoria la oncoproteína E7 del HPV-16 en hojas de *Nicotiana benthamiana* usando como vector el virus X de la papa (Franconi, *et al* 2002). Los extractos foliares se usaron para inmunizar ratones los cuales presentaron disminución en sintomatología comparado con el grupo control y protección contra un reto tumoral. 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. Por otro lado, dado a 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 *et al* 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).

4.3 Construcción de líneas de jitomate TA234L1Mut HPV-16 y TA234L1Mut HPV-16 E6E7 y Transformación de Jitomate.

Las dos líneas de plantas de jitomate transgénico se construyeron en la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV Guanajuato (Paz de la Rosa *et al* 2006) de la siguiente manera: se utilizó la clona del gen optimizado L1Mut del HPV-16 (Collier *et al* 2002) que fue donada por el Dr. Stefan Schwartz y amplificada mediante PCR con los oligos 5': CCGCTCTCGAGAATATGAGCCTGTGGCTGCCAGCGAGGCC y el oligo 3': CCGCTACGGTACCTTACAGCTTACGTTTTTTCGTTTTAGCAG. Posteriormente fue clonada en los sitios XhoI al 5' y el KpnI al 3' en el vector binario pCAMBIA 2300 bajo el promotor constitutivo 35S CaMV y el terminador del mismo 35S como secuencia de poliadenilación. Posteriormente, se diseñó un péptido de epítopes que contienen secuencias reportadas de los oncogenes E6 y E7 del HPV-16 con actividad citotóxica mediada por células T (Kadish *et al* 2002, Khammanivong *et al* 2003, Rensing *et al* 1995). La secuencia de aminoácidos que conforman el péptido sintético comienza con los aminoácidos (37-54) E7:(49-57) E7:(16-30) E6:(86-93)E7 y termina con la secuencia de envío a retículo endoplásmico SEKDEL (EIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFPARKLPQLCTELQTTITLGIVCPISEKDEL). Estos epítopes son reconocidos por ratones C57BL/6 los cuales tienen el haplotipo H-2b. Esta secuencia fue sintetizada por la compañía Genescript y se fusionó al extremo 3' del gen L1Mut HPV-16 reemplazando la secuencia de los últimos 34 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la proteína estructural mediante PCR para generar el gen quimérico L1Mut E6/E7. El gen quimérico, al igual que el gen L1Mut, fue clonado entre el promotor y terminador 35S CaMV y el cassette de expresión fue clonado en el vector pCAMBIA 2300. Estos vectores contienen como gen de selección *nptII* que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II la cual confiere resistencia al antibiótico kanamicina a las plantas transgénicas. El vector 2301 además del gen de selección *nptII*, tiene el gen reportero *uidA* que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Las construcciones se llamaron p2300L1MutHPV-16 a la que contiene la versión mutada

del gen L1 y p2300L1MutE6/E7HPV-16 a la que contiene la fusión con los epítopes citotóxicos E6/E7.

La transformación y regeneración de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) se realizó de acuerdo al protocolo descrito por (Gutierrez *et al* 2005) usando el genotipo TA234 donado por el Dr. Steve Tanksley de la Universidad de Cornell. Este protocolo consiste en la transformación de hojas cotiledonares de 8 días de edad, los cuales se sometieron a un cocultivo con la cepa de *Agrobacterium* que contenía un vector de transformación y el compuesto fenólico acetosiringona 20µM. Los explantes se colocaron en medio selectivo, se promovió una organogénesis del tejido transformado mediante el uso de zeatina como regulador de crecimiento. Los brotes que resultaron se transfirieron a medio de enraizamiento con kanamicina 100mg/l. Las plántulas que desarrollan raíces bajo esta selección se pasaron a suelo y se crecieron en el invernadero.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El uso de partículas tipo virales (VLPs) en estudios de Fase clínica II y III, mediante la aplicación de tres dosis de la vacuna tetravalente (Gardasil®, Merck SD) constituida por VLPs de HPV-16, -18, -6 y -11; o de la vacuna bivalente (Cervarix®, Glaxo SmithKline), constituida por VLPs de HPV-16 y -18, han mostrado tener alta efectividad profiláctica mediante la producción de anticuerpos neutralizantes para proteger a las mujeres de infecciones por HPV de los genotipos virales contenidos en las vacunas (Harper *et al* 2004; Villa *et al* 2005; Mao *et al* 2006). No obstante, en mujeres que presentan infección por HPV o displasias de alto grado, la respuesta a la vacunación con estas VLPs ha sido poco eficiente. Por lo tanto, surge la necesidad de generar VLP's quiméricas con capacidad terapéutica, que contengan epítopes derivados de las proteínas oncogénicas E6 y E7, frecuentemente encontradas en las células infectadas por HPV o células tumorales de cáncer cérvicouterino, los cuales pueden ser blancos idóneos para ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos y en su caso eliminar a las células infectadas (Lin *et al* 2010). En modelos de vacunación de ratones con VLP's, híbridos de la proteína L1 de HPV/E7 HPV16 y capsómeros de L1 de HPV16, la inducción de linfocitos T citotóxicos además de anticuerpos neutralizantes hacia epítopes específicos de la proteína L1 han mostrado una efectiva protección continua hacia el reto subsecuente con viriones infecciosos y células tumorales infectadas por HPV-16 en los animales inmunizados (Xu *et al* 2006; Bian *et al* 2008). Recientemente, en el laboratorio del Dr. Gómez-Lim de la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV Guanajuato, se logró la expresión en plantas de jitomate TA234-L1MutE6E7HPV-16, de VLPs quiméricas (cVLPs) constituidas por la proteína L1 y epítopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 (Paz de la Rosa, 2009). En consecuencia, en el presente estudio se analiza el efecto terapéutico de las cVLPs derivadas de la planta transgénica de jitomate. A través de un modelo *in vivo* con ratones de la cepa C57BL/6, se evalúa si después de la inmunización con cVLP's, es posible inducir protección de los animales inmunizados contra el reto tumoral de células TC-1. Este estudio será de gran relevancia para evidenciar el potencial terapéutico de estas cVLPs y con base en ello establecer los mecanismos celulares

efectores inducidos tras la vacunación.

## **HIPÓTESIS**

El desarrollo del cáncer cérvicouterino se asocia estrechamente con la infección por HPV, por tanto, se ha propuesto que proteínas virales, como E6 y E7, que son sobreexpresadas en células infectadas por virus o células transformadas (tumorales), sean candidatos idóneos para reconocimiento inmune por medio de linfocitos T citotóxicos. De hecho, se han identificado varios epítopes derivados de las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV-16 capaces de generar respuestas citotóxicas específicas por linfocitos T. Asimismo la vacunación de ratones con algunos epítopes ha demostrado tener propiedades antitumorales. Recientemente se logró construir partículas tipo virales quiméricas (cVLP) conteniendo epítopes derivados de las proteínas E6 y E7 de HPV-16. En consecuencia la inmunización de ratones con partículas tipo virales quiméricas inducirá la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T citotóxicos específicos capaces proveer protección ante un reto tumoral con células que expresen las proteínas oncogénicas E6 y E7 de HPV-16.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta inmune celular inducida mediante la inmunización con partículas tipo virales obtenidas en plantas de jitomate constituidas por la proteína estructural L1 (VLPs) y L1 con antígenos de las oncoproteínas E6 y E7 de HPV-16 (cVLPs), en ratones de la cepa C57BL/6.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Obtener y purificar partículas tipo virales de plantas de jitomate transgénico de las líneas TA234-L1MutHPV-16 (VLPs) y TA234-L1MutE6E7HPV-16 (cVLPs).

Evaluar la capacidad citotóxica específica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con VLPs y cVLPs.

Analizar la capacidad inmunoterapéutica de las VLPs y las cVLPs ante un reto tumoral.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Extracción de VLPs y cVLPs**

Las partículas tipo virales constituidas por la proteína L1 (VLPs) y partículas tipo virales quiméricas formadas por L1 con antígenos de E6 y E7 de HPV16 (cVLPs), fueron obtenidas a partir de frutos maduros de jitomate generados por el Dr. Miguel Angel Gómez-Lim en la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV Guanajuato.

La extracción de los VLPs y cVLPs se realizó de la siguiente manera: a partir de los frutos maduros congelados en nitrógeno líquido, se muelen hasta formar un polvo fino. 150 g de tejido se disuelven en 150 ml de PBS estéril y se mantienen en agitación constante durante 12 hrs a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm (revoluciones por minuto) durante una hora en frío y se recupera el sobrenadante de cada uno.

### **Purificación de VLPs y cVLPs**

Los extractos de VLPs y cVLPs se filtran sobre papel Whatman y después con filtro Millipore de 0.8 µM. Posteriormente el extracto filtrado se hace pasar por una columna de afinidad preparada previamente con IgGs provenientes de suero de mujeres vacunadas con Gardasil®. Los anticuerpos IgG se purifican con proteína G-Sefarosa y se acoplan a Sefarosa 4B CNBr-activada (Sigma). Después de la cromatografía, la columna de Sefarosa – IgG, se lava con 2000 µL de un primer buffer de lavado denominado buffer 1 que consiste en 50mM de Tris Base, 150 mM de NaCl y 5mM de EDTA, pH 7.8, después se hace otro lavado con 4000 µL de buffer 2 que contiene 150mM de NaCl y 5mM de EDTA, pH 7.8 y las VLPs o cVLP se eluyen con 1000 µL de glicina 100 mM, pH 4.0. Las fracciones que contienen VLPs o cVLPs se neutralizan con 100 mM de Tris-HCl pH 9.0. La cantidad de VLPs o cVLPs purificadas se cuantifica mediante ELISA como se describe a continuación.

---

**Cuantificación de VLPs y cVLPs por ELISA**

Se prepara un stock de Gardasil® (Merck SD) (vacuna tetravalente, constituida por VLPs de HPV-16, -18, -6 y -11) para hacer la curva patrón de 1000 ng/ml en un volumen de PBS de 1.5 ml. Para esto se ocupa la siguiente fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Si Gardasil® tiene una concentración de 240,000 ng/ml:

$$V_2 = (1000 \text{ ng/ml}) (1.5 \text{ ml}) / (240,000 \text{ ng/ml})$$

$$V_2 = 0.00625 \text{ ml} = 6.25 \text{ } \mu\text{L} \text{ de Gardasil}^\circ \text{ en } 1500 \text{ } \mu\text{L} \text{ de PBS}$$

$$\text{Si el stock es de } [1000 \text{ ng/ml}] \times = [10 \text{ ng/ml}] [1000 \text{ } \mu\text{L}]$$

$$X = [10 \text{ ng/ml}] [1000 \text{ } \mu\text{L}] / [1000 \text{ ng/ml}] = 10 \text{ } \mu\text{L} \text{ se toman del Stock para la curva patrón.}$$

Estándares para la curva:

Estándares	Vol. Stock	Vol. PBS
10 ng	10 µL	990 µL
25 ng	25 µL	975 µL
50 ng	50 µL	950 µL
100 ng	100 µL	900 µL
250 ng	250 µL	750 µL
500 ng	500 µL	500 µL

**Tabla 3.** Estándares para la curva patrón.

Preparación de Muestra:

Para cada elusión se necesitan 300 µL así que ésta se diluye a una concentración de 1/50, si el volumen a ocupar es de 400 µL entonces:

$$400 \mu\text{L}/50 = 8 \mu\text{L de elución} / 392 \mu\text{L de PBS}$$

Una placa de ELISA de 96 pozos fondo plano (Corning, USA) es cubierta con 100 µL de cada preparación de la curva patrón y de las muestras de VLPs y cVLPs purificadas por

cromatografía de inmunoafinidad. Todas las muestras se evalúan por triplicado. La placa se incuba toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente se hacen dos lavados con TBS-0.1% tween 20 (TBS-tween20), 300 µL por pozo y se bloquea la placa con albúmina sérica bovina (BSA) al 2% en TBS-01% Tween 20 (200 µL por pozo). Las placas se incuban durante dos horas a 37 °C y después de este tiempo se lavan cuatro veces con TBS-tween 20. Posteriormente, como anticuerpo primario se utiliza suero de mujeres vacunadas con Gardasil® diluido 1:500 en BSA al 2% (100 µL). Luego de incubar dos horas a 37 °C las placas se lavan seis veces con TBS-tween 20 y se incuban con 100 µL por pozo de anticuerpo secundario de cabra anti IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed) a una dilución 1:5000 en BSA al 2%. Las placas se incuban por dos horas más a 37 °C. Después de ocho lavados con TBS-tween 20, las placas se incuban con 100µl por pozo de sustrato para fosfatasa Sigma 104 disuelta en dietanolamina (0.06 g de fosfatasa disuelta en 10 ml de dietanolamina). Finalmente se incuba por una hora a 37 °C y se lee a 405 nm en el lector de placas de ELISA (Molecular Devices). La concentración de VLPs o cVLPs se calcula con el promedio de las tres lecturas por muestra e interpolando en la curva estándar.

### **Líneas Celulares y Animales Experimentales**

Se utilizó en este trabajo la línea celular TC-1 (cultivo tisular número 1) derivada de un carcinoma de pulmón de ratón y co-transfectada permanentemente con los genes E6 y E7 de HPV-16 junto con el gen c-Ha-ras (Lin *et al* 1996). Además se usó una línea celular T-C1 transfectada transitoriamente con la proteína L1.

Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-D<sup>b</sup>) de 6-8 semanas de edad (Harlan), mantenidos bajo condiciones estériles libres de patógenos.

### **Inmunización de Ratones**

Cuatro grupos de cuatro ratones cada uno se inmunizaron de la siguiente manera: el primer grupo con 5 µg VLPs, el segundo grupo con 5 µg de cVLPs, el tercer grupo con 100 µg de péptido RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de HPV16, el cual está

incluido en el péptido de epítopes E6/E7 de la cVLP y el cuarto grupo con 10 µg de la vacuna Gardasil®. Cada grupo se inmunizó tres veces en un lapso de 15 días entre cada dosis. Los ratones se sacrificaron después de 15 días de la tercera inmunización para remover el bazo y obtener linfocitos T que fueron utilizados en ensayos de citotoxicidad.

### **Estimulación de Linfocitos T y Ensayos de Citotoxicidad**

Brevemente, los eritrocitos del tejido del bazo se lisaron con buffer ACK (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 ml KHCO<sub>3</sub>, 0.1 ml Na<sub>2</sub>EDTA) y los linfocitos se mantuvieron durante 6 días en cultivo en medio IMDM (GIBCO) + 10% de SFB (Gibco), estimulados con el antígeno relacionado al tratamiento que recibieron los ratones. Los linfocitos de ratones inmunizados con péptido se estimularon con 10 µM de péptido RAHYNIVTF. Los linfocitos T obtenidos de ratones inmunizados con VLP se estimularon con 1 µg/mL de antígeno (VLPs, cVLPs, péptido o Gardasil®). A los días 2 y 5 de cultivo se adicionó IL-2 (100µ/mL). Después de dos reestímulos, se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad. Las células blanco que se utilizaron en el ensayo consistieron en la línea celular TC-1, derivada de un carcinoma de pulmón de ratón y transfectada permanentemente con los genes E6 y E7 de HPV-16 junto con el gen Ras (Lin *et al* 1996); y TC-1 transfectadas transitoriamente con el gen L1 del HPV-16 (TC-1/L1). Aproximadamente 1x10<sup>4</sup> células blanco previamente marcadas con 5µCi de <sup>51</sup>Cr, fueron incubadas con diferentes proporciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> pre-estimulados y después de 4 hrs de co-cultivo se colectaron 100 µl del sobrenadante libre de células, se transfirieron a viales y se analizó la actividad del <sup>51</sup>Cr liberado, a través de un contador gamma (B. D. Cobra II). Células blanco incubadas con 5% de Tritón X-100 (Sigma USA) o con medio solo, fueron usadas para determinar la liberación máxima y espontánea respectivamente.

El porcentaje de lisis de cada vial se calculó como:

$$\frac{(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea})}{(\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})} \times 100.$$

### **Evaluación de la Respuesta Ante el Reto Tumoral**

Tres grupos de cuatro ratones cada uno, se inocularon (en la subdermis de la parte dorsal) con  $1 \times 10^6$  células tumorales TC-1. Después de diez días se observó un crecimiento tumoral palpable de aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$ ; dos de estos grupos de cuatro ratones cada uno, se inmunizaron vía intraperitoneal en un esquema de primera dosis y dos refuerzos cada 15 días con  $5 \mu\text{g}$  de VLPs o cVLPs en emulsión con adyuvante de Freund (Sigma, USA). Como grupo testigo se monitoreo sólo el crecimiento tumoral sin ningún tratamiento.

El crecimiento tumoral se fue midiendo con ayuda de un vernier para hacer una comparación del desarrollo del mismo entre los tres grupos (Bian *et al* 2008). Dicha medición se calculó como volumen tumoral y se utilizó la fórmula de:  $\text{Volumen} = \text{largo} \times \text{ancho}^2 / 2$  (Paz de la Rosa, 2009).

Los datos obtenidos de volumen tumoral fueron analizados para ver diferencias significativas entre el grupo control y los grupos experimentales usando una prueba de ANOVA de una cola.

## RESULTADOS

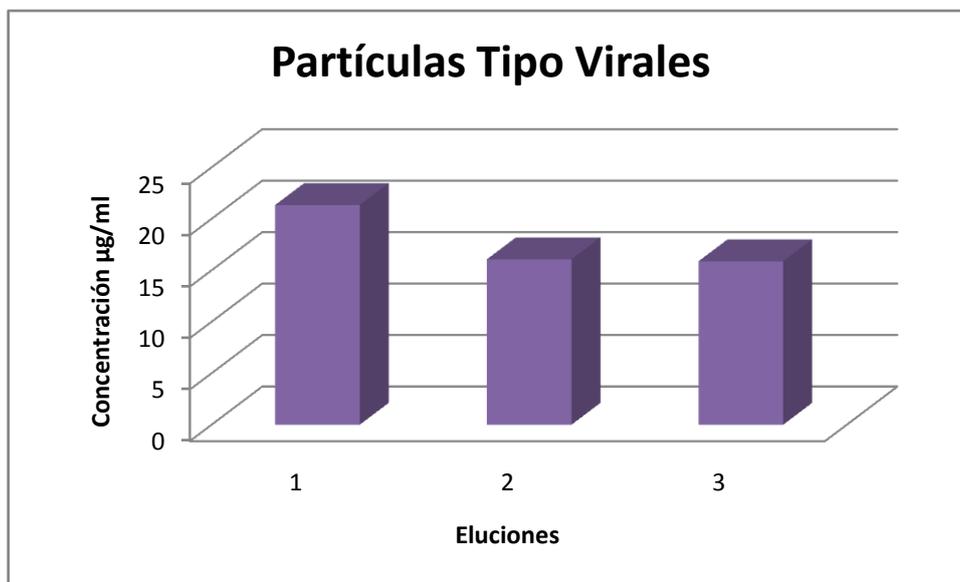
### **Obtención y purificación de partículas tipo virales (VLPs) de plantas de jitomate transgénico de las líneas TA234-L1MutHPV-16 y TA234-L1MutE6E7HPV-16.**

Para este estudio, primero fue necesario obtener y purificar las partículas tipo virales a partir de frutos de las líneas de jitomate transgénico TA234-L1MutHPV-16 (VLPs) y TA234-L1MutE6E7HPV-16 (cVLPs) congelados en nitrógeno líquido y purificarlos por medio de cromatografía de inmunoafinidad.

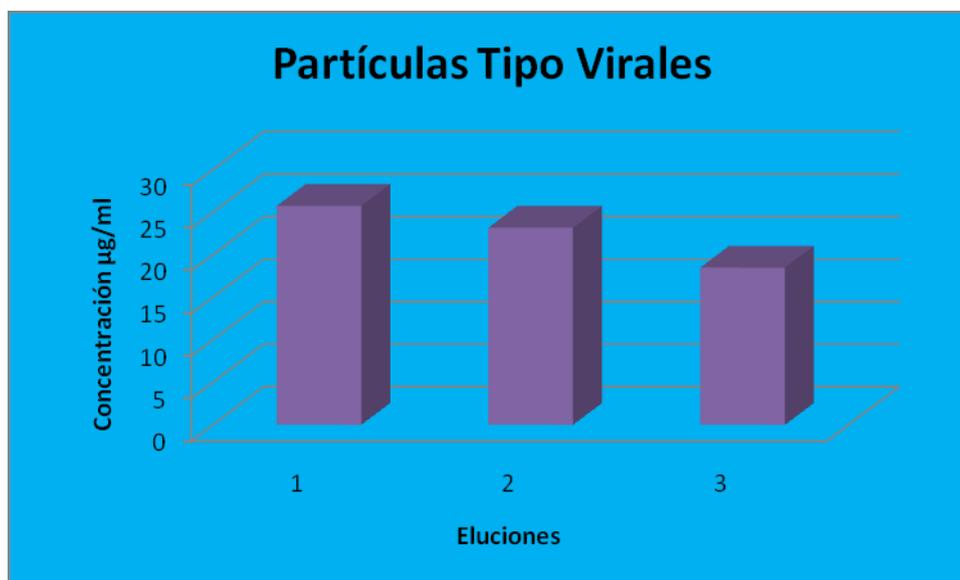
Se realizaron dos extracciones a partir de 150 g de tejido cada una y se obtuvieron tres eluciones; posteriormente a través de ensayos de ELISA se cuantificaron las concentraciones obtenidas de VLPS y cVLPs, para después realizar la inmunización de los ratones con estas partículas. En las dos extracciones de VLPs se obtuvo la mayor concentración en la primera elución: 21.41 µg/ml y 25.73 µg/ml respectivamente, y

luego fue disminuyendo; en la segunda elución: 16.06  $\mu\text{g/ml}$  y 23.17  $\mu\text{g/ml}$  y la tercera elución 15.87  $\mu\text{g/ml}$  y 18.48  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente (**Gráfica 1 y Gráfica 2**).

En la **tabla 4** se observan todas las concentraciones en  $\mu\text{g/ml}$  de las VLPs, obteniendo un total de 120.66  $\mu\text{g/ml}$ .



**Gráfica 1.** Primera extracción de Partículas Tipo Virales (VLPs). Concentraciones obtenidas de VLPs a partir de frutos de jitomate transgénicos en tres diferentes eluciones.



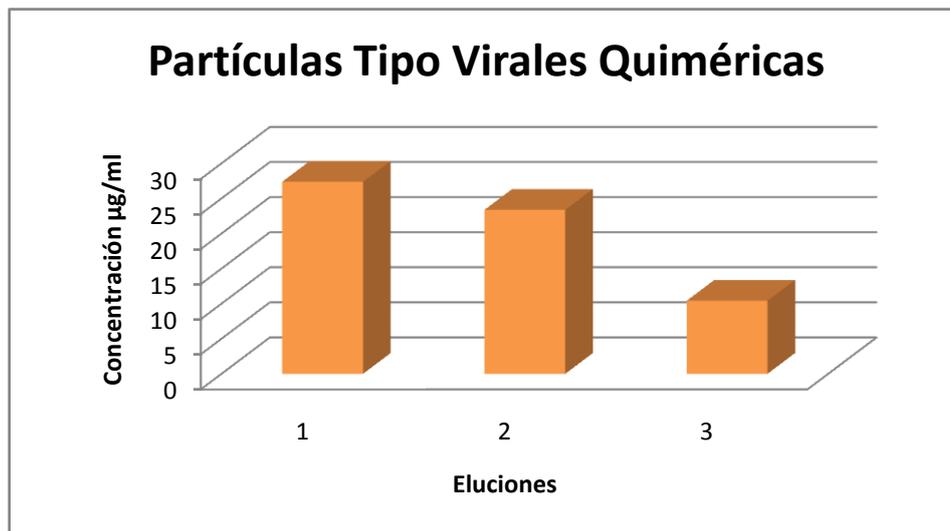
**Gráfica 2.** Segunda extracción de Partículas Tipo Virales (VLPs). Concentraciones obtenidas de VLPs a partir de frutos de jitomate transgénicos en tres diferentes eluciones.

CONCENTRACIÓN DE VLPs

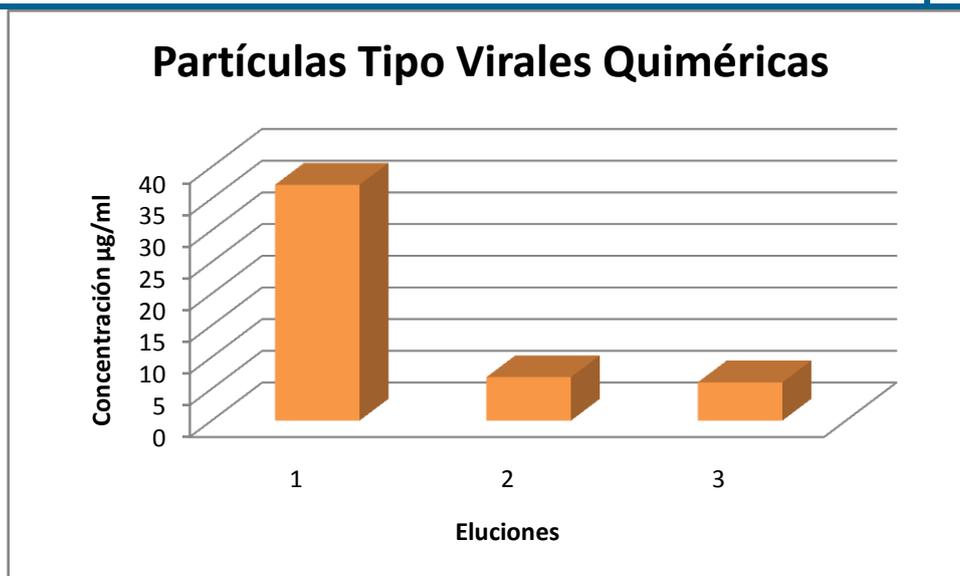
ELUCIÓN	EXTRACCIÓN 1 (µg/ml)	EXTRACCIÓN 2 (µg/ml)
1	21.34	25.73
2	16.06	23.17
3	15.87	18.48
<b>CONC. TOTAL</b>	120.66 µg/ml	

**Tabla 4.** Cuantificación de VLPs a partir de dos extracciones de tejido de jitomate transgénico.

La obtención de cVLPs se llevó a cabo de la misma manera que las VLPs y las concentraciones obtenidas en ambas extracciones en la primera elución fue más alta con 27.36 µg/ml y 37.18 µg/ml respectivamente, que las demás eluciones (23.35 µg/ml, 6.85 µg/ml y 10.40 µg/ml, 6.04 µg/ml respectivamente) (**Gráfica 3 y Gráfica 4**). La concentración total de las cVLPs fue de 111.21 µg/ml (**Tabla 5**).



**Gráfica 3.** Primera extracción de Partículas Tipo Virales quiméricas (cVLPs). Concentraciones obtenidas de cVLPs a partir de frutos de jitomate transgénicos en tres diferentes eluciones.



**Gráfica 4.** Segunda extracción de Partículas Tipo Virales quiméricas (cVLPs). Concentraciones obtenidas de cVLPs a partir de frutos de jitomate transgénicos en tres diferentes eluciones.

**CONCENTRACIÓN DE cVLPs**

ELUCIÓN	EXTRACCIÓN 1 (µg/ml)	EXTRACCIÓN 2 (µg/ml)
1	27.36	37.18
2	23.35	6.85
3	10.40	6.04
<b>CONC. TOTAL</b>	111.21 gµ/ml	

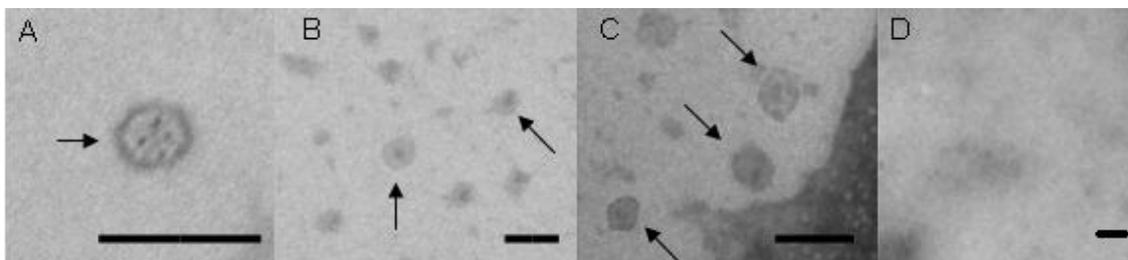
**Tabla 5.** Cuantificación de cVLPs a partir de dos extracciones de tejido de jitomate transgénico.

Estas concentraciones fueron obtenidas sacando el promedio de las muestras que se colocaron por triplicado en la placa, después este promedio se interpoló en la curva estándar que se realizó con la vacuna Gardasil y finalmente los resultados obtenidos

que estaban en ng/ml se transformaron a  $\mu\text{g/ml}$  para inyectarle a cada ratón del grupo correspondiente 5 $\mu\text{g}$  de VLP o cVLP.

Para obtener el porcentaje de proteína total soluble (PTS) se realizó una prueba de Bradford al extracto de jitomate previo a la extracción de las VLPs, para esto se utilizó el reactivo Bradford (Sigma Reagent) siguiendo la metodología del inserto del reactivo, esto con la finalidad de saber la concentración total de proteína en la muestra y después, se comparó este total con la concentración final de VLPs dando como resultado un 0.05% de PTS.

En la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV Guanajuato, por microscopía electrónica, se confirmó que las proteínas expresadas en jitomate conservaban la capacidad de ensamblarse en VLPs y cVLPs (**Figura 6**) (Paz de la Rosa, 2009).

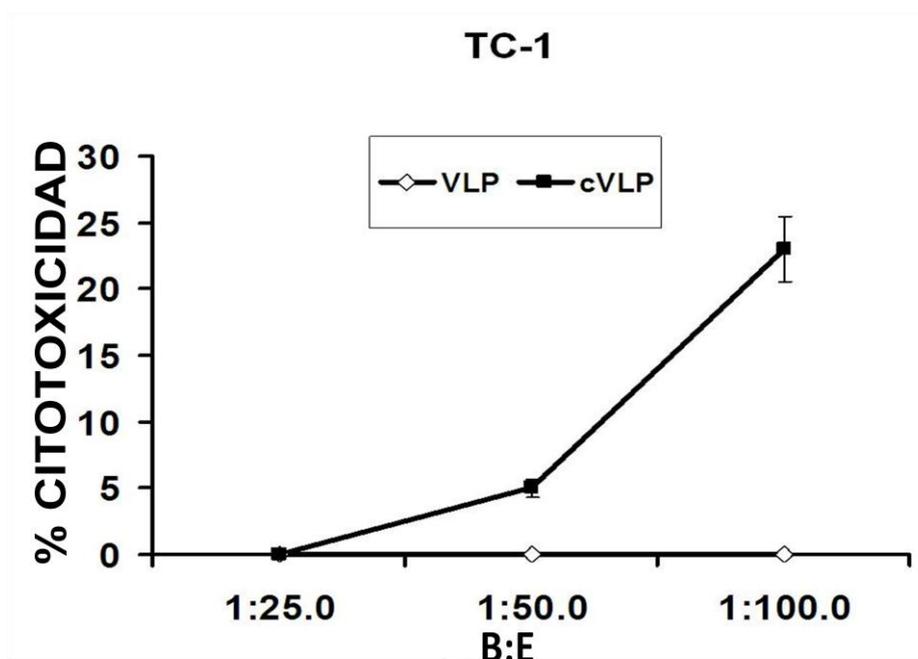


**Figura 6. Estructuras de VLP y cVLP obtenidas en frutos jitomates.** (A) VLPs de Gardasil® como control positivo. (B) Extractos de líneas L1Mut (VLP). (C) Extractos de líneas L1MutE6/E7 (cVLP). (D) Extractos de plantas no transformadas. Las flechas señalan las partículas. Las barras indican 0.1 $\mu\text{m}$ .

#### **Evaluación de la capacidad citotóxica específica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con VLPs y cVLPs.**

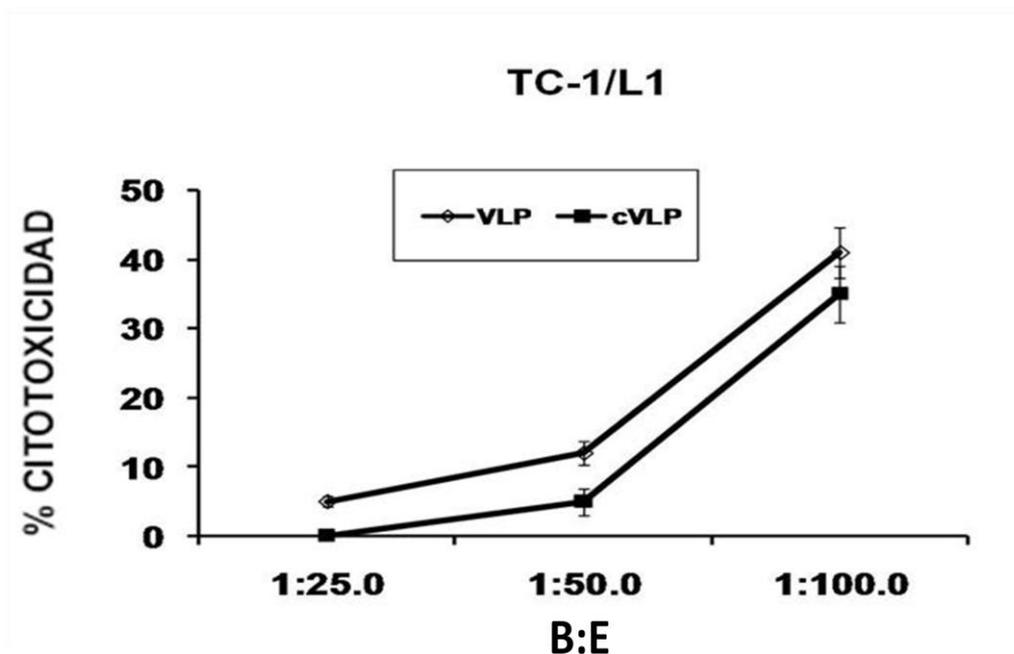
Para analizar la capacidad citotóxica específica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con VLPs y cVLPs, se inmunizaron cuatro grupos de ratones de la cepa C57BL/6 (H-2b) con: VLPs, cVLPs, vacuna Gardasil® y péptido antigénico RAHYNIVTF

derivado de la proteína E7 de HPV-16. Posteriormente, se extrajeron linfocitos T del bazo y fueron re-estimulados *in vitro* con los antígenos utilizados en la inmunización, así como en presencia de 20 ng/mL de interleucina-2 recombinante (rIL-2). Después se evaluó el efecto citotóxico de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> sobre células TC-1, las cuales están co-transfectadas con los genes E6, E7 de HPV-16 y c-Ha-ras, además de que presentan el mismo haplotipo H-2b (Bian *et al* 2008); asimismo se emplearon células TC-1 expresando transitoriamente el gen de L1 de HPV-16 (TC-1/L1). Como puede observarse en la **Gráfica 5** el grupo inmunizado con VLPs, sus linfocitos T CD8<sup>+</sup> no mostraron lisis sobre las células tumorales en ninguna de las diferentes proporciones utilizadas, lo que significa que no hubo reconocimiento hacia las células tumorales TC-1; mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> derivados de ratones inmunizados con cVLPs si fueron capaces de lisar a las células tumorales TC-1 alcanzando un máximo de 23% de citotoxicidad en la proporción 1:100.



**Gráfica 5.** Actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con VLPs o cVLPs derivadas de jitomate. La actividad de linfocitos T citotóxicos fue evaluada sobre células tumorales epiteliales de pulmón TC-1 que expresan las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B: células banco, E: células efectoras.

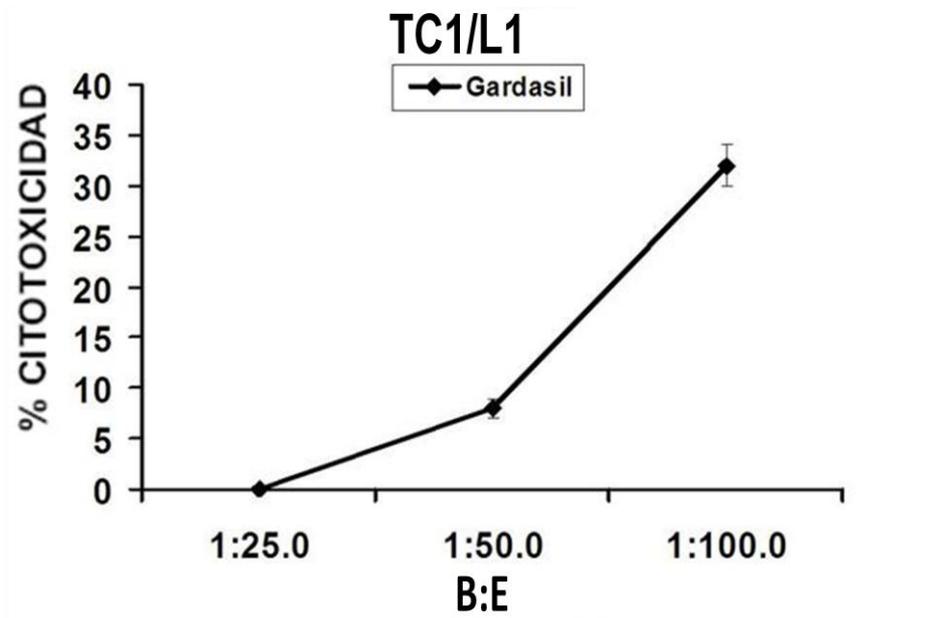
Cuando las células TC-1 fueron transfectadas de manera transitoria con el gen de L1 de HPV-16 (TC-1/L1), los linfocitos T CD8<sup>+</sup> derivados de los ratones inmunizados con VLP y cVLP, fueron capaces de lisar a las células tumorales TC-1/L1, siendo la proporción 1:100 donde la citotoxicidad alcanzó un porcentaje de 40% y 31% respectivamente (Gráfica 6).



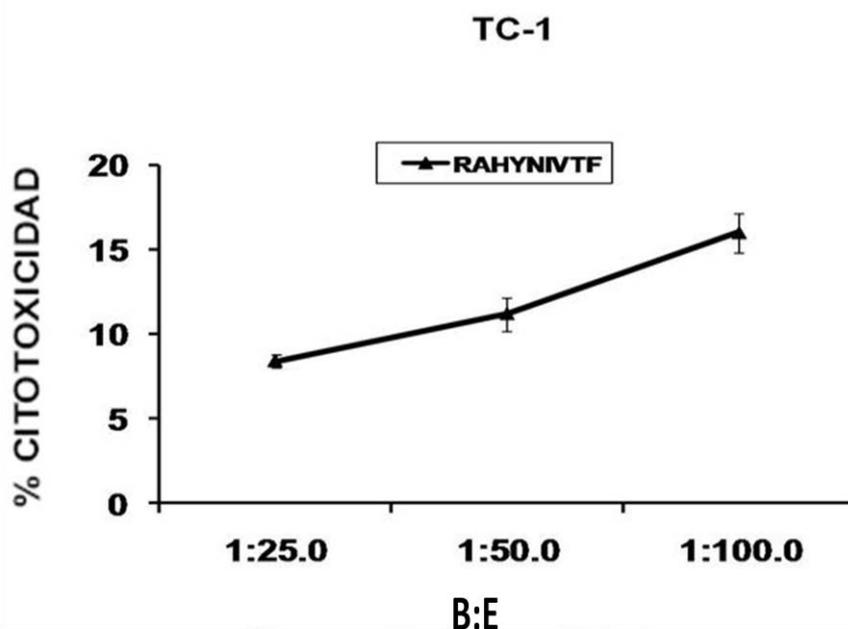
**Gráfica 6.** Actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con VLP o cVLP derivadas de jitomate. La actividad de linfocitos T citotóxicos fue evaluada sobre células tumorales epiteliales de pulmón TC-1 transfectadas transitoriamente con el gen de L1 de HPV-16 (TC-1/L1). B: células blanco, E: células efectoras.

Asimismo, cuando linfocitos T de ratones inmunizados con la vacuna Gardasil<sup>®</sup> fueron retados contra las células TC-1/L1, se observó un 30% de citotoxicidad a una proporción de 1:100 (Gráfica 7). Como control positivo de la actividad citotóxica, ratones C57BL/6 fueron inmunizados sólo con el péptido antigénico RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de HPV-16, el cual está incluido en el péptido de epítopes

E6/E7 de la cVLP. Los resultados obtenidos demuestran que los linfocitos T citotóxicos derivados de estos ratones fueron capaces de lisar a las células TC-1 (**Gráfica 8**).



**Gráfica 7.** Actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con la vacuna Gardasil®. La actividad de linfocitos T citotóxicos fue evaluada sobre células tumorales epiteliales de pulmón TC-1 transfectadas transitoriamente con el gen de L1 de HPV-16 (TC-1/L1). B: células blanco, E: células efectoras.



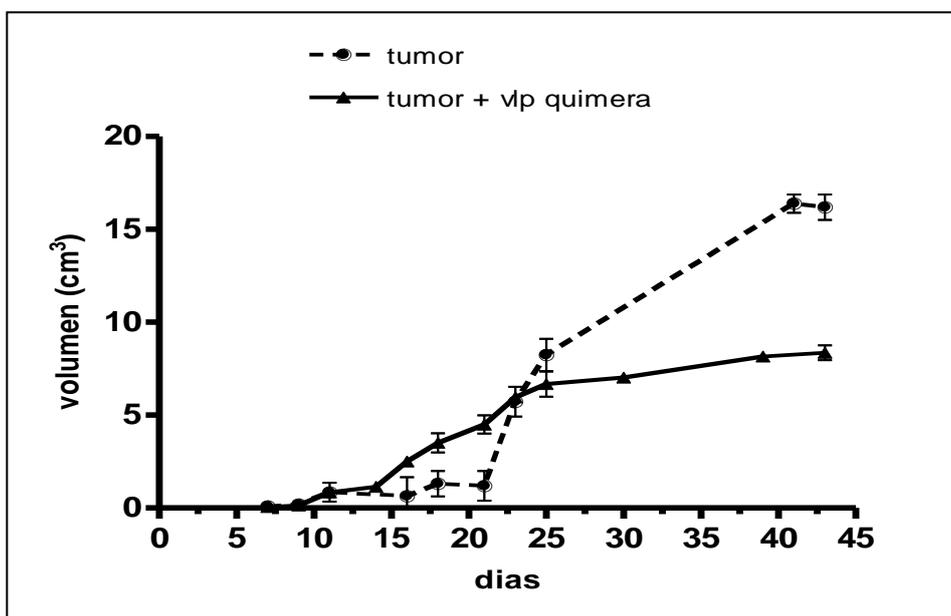
**Gráfica 8.** Actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con el péptido antigénico RAHYNIVTF de la proteína E7 de HPV-16. La actividad de linfocitos T citotóxicos fue evaluada sobre células tumorales epiteliales de pulmón TC-1 que expresan las proteínas E6 y E7 de HPV-16. B: células blanco, E: células efectoras.

### **Análisis de la capacidad inmunoterapéutica de las VLPs y las cVLPs ante un reto tumoral.**

Una vez que se demostró que *in vitro* los linfocitos T derivados del bazo de ratones inmunizados con VLPs derivados de jitomate fueron capaces de lisar a las células tumorales TC-1, y dado que la respuesta inmune celular es mediada por los linfocitos T citotóxicos, la cual es requerida para la eliminación de células infectadas por virus o células tumorales, se procedió a evaluar el efecto terapéutico de la inmunización con VLPs derivadas de las plantas transgénicas ante un reto tumoral. Para ello, ratones de la cepa C57BL76, fueron inoculados en la parte dorsal con  $1 \times 10^6$  células tumorales TC-1, y se evaluó si ratones que desarrollaban tumores respondían a la vacunación. Al décimo día de la inoculación con células TC-1 se observó crecimiento tumoral y se inició la aplicación de  $5 \mu\text{g}$  de VLPs y cVLPs respectivamente cada 15 días y se procedió

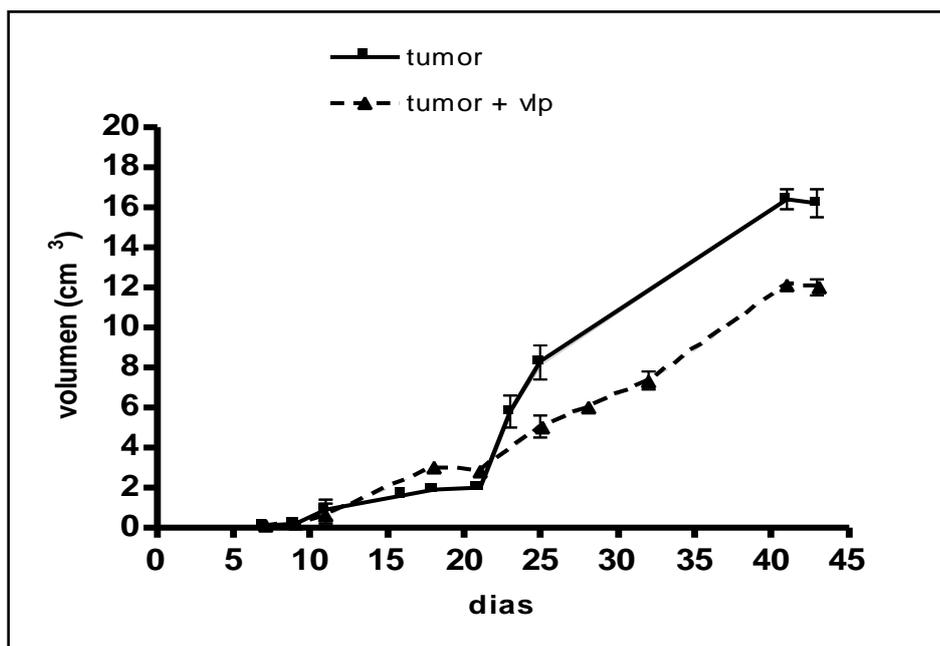
a evaluar su efecto sobre el crecimiento tumoral. Como puede apreciarse en la **Gráfica 9**, en el grupo sin vacunación el tumor llegó a alcanzar un volumen de 16 cm<sup>3</sup> en promedio; mientras que en el grupo que recibió 3 aplicaciones de cVLPs, se observó una reducción del 50% en el crecimiento tumoral (7 cm<sup>3</sup>). En tanto que en ratones inmunizados con VLPs la reducción del tamaño tumoral fue cercano al 20% (12 cm<sup>3</sup>) hasta el día 45 después de la inoculación de las células tumorales (**Gráfica 10**). Los resultados de los grupos de cVLP y VLP fueron comparados respecto al grupo testigo utilizando una prueba ANOVA de una cola

**Volúmen tumoral en ratones inoculados con cVLPs**



**Gráfica 9.** Efecto terapéutico de VLPs obtenidas de las plantas transgénicas en el crecimiento tumoral. Ratones de la cepa C57BL/6 haplotipo H-2b se inocularon con  $1 \times 10^6$  células TC-1, del mismo haplotipo. Al día 15 los ratones se inmunizaron con 5  $\mu$ g de cVLP de jitomate cada 15 días en un esquema de primera dosis y dos refuerzos. El volumen de los tumores se calculó con la fórmula:  $\text{volumen} = (\text{largo} \times \text{ancho}^2) / 2$ .  $P < 0.0001$ .

Volumen tumoral en ratones inoculados con VLP



**Gráfica 10.** Efecto terapéutico de VLPs obtenidas de las plantas transgénicas en el crecimiento tumoral. Ratones de la cepa C57BL/6 haplotipo H-2b se inocularon con  $1 \times 10^6$  células TC-1, del mismo haplotipo. Al día 15 los ratones se inmunizaron con  $5 \mu\text{g}$  de VLP de jitomate cada 15 días en un esquema de primera dosis y dos refuerzos. El volumen de los tumores se calculó con la fórmula:  $\text{volumen} = (\text{largo} \times \text{ancho}^2) / 2$ .  $P < 0.571$ .

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente se comercializan dos vacunas profilácticas para infecciones con HPV-16 y 18 (los dos tipos virales más prevalentes en cáncer cérvicouterino), las cuales han demostrado tener eficacia a través de la inducción de anticuerpos neutralizantes de la proteína L1 de la cápside (Gissmann, 2009). Sin embargo, en pacientes con infecciones persistentes, estas vacunas no protegen contra la progresión a neoplasia. Por consiguiente, se han empezado a desarrollar vacunas terapéuticas con epítopes de proteínas tempranas E6 y E7, que son esenciales para la inducción y mantenimiento del fenotipo maligno en células tumorales de cáncer cérvicouterino; los cuales pueden ser blancos idóneos para ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos y en su caso eliminar a las células infectadas (Cid, 2009; Lin *et al* 2010). Se han realizado varios estudios en donde se demuestra que la inmunización con las oncoproteínas E6 y E7 en modelos de ratón genera una respuesta inmune específica contra estos epítopes (Frazer, 1996; Rensing *et al* 1995; Khammanivong *et al* 2003).

Las vacunas con partículas tipo virales (VLPs) derivadas de una estructura vegetal han sido consideradas en los últimos años como una atractiva estrategia en la inmunoterapia del cáncer debido a su seguridad, costo y efectividad (Venuti *et al* 2009). Recientemente, se ha logrado la transformación de plantas de jitomate con el gen L1MutE6/E7 generando la línea TA234-L1MutE6E7HPV-16, que expresa la proteína de fusión L1MutE6/E7 la cual se ensambla en VLPs quiméricas (cVLPs) (constituidas por la proteína L1 epítopes de las proteínas E6 y E7 de HPV-16) (Paz de la Rosa, 2009). En consecuencia, el presente estudio se realizó con la finalidad de analizar el efecto terapéutico de las cVLPs derivadas de la planta transgénica de jitomate.

A través de un modelo *in vivo* con ratones de la cepa C57BL/6, se evaluó si después de la inmunización con cVLPs, era posible la inducción de protección de los animales inmunizados contra el reto tumoral de células TC-1. Para ello, fue necesario primero obtener y purificar las partículas tipo virales a partir de frutos de las líneas de jitomate transgénico TA234-L1MutHPV-16 (VLPs) y TA234-L1MutE6E7HPV-16 (cVLPs).

La purificación de las partículas tipo virales se realizó a través de cromatografía de inmunoafinidad, representó una nueva propuesta para la obtención de las VLPs. Esta técnica resultó muy confiable y segura porque a través de anticuerpos contra estas partículas se reconoce a las VLPs de manera conformacional. Además de que la técnica es relativamente sencilla y ofrece una buena opción para ser utilizada en la purificación de VLPs, ya que bajaría los costos de manera considerable, reduciendo el tiempo en el laboratorio para su obtención. Actualmente, las técnicas de purificación empleadas son a través de ultracentrifugación en un gradiente de sucrosa, gradientes de densidad de cloruro de cesio y cromatografía de exclusión por tamaño (Park *et al* 2008). Sin embargo, utilizando estos métodos aún quedan ciertos contaminantes, además de que, presentan la desventaja de ser muy costosos, lo que se traduce en altos costos del producto final para el público (Schadlich *et al* 2009).

Las VLPs y cVLPs purificadas a través de la técnica de cromatografía de afinidad demostraron tener la capacidad de ensamblarse en VLPs (L1Mut) y cVLPs (L1MutE6/E7) de tamaño y forma similar a las VLPs de la vacuna Gardasil®, lo cual fue confirmado por microscopia electrónica en el CINVESTAV de Guanajuato. Asimismo, el porcentaje de proteína total soluble para ambas partículas fue de 0.05%, dato que concuerda con lo reportado anteriormente para este sistema (Paz de la Rosa, 2009). Las partículas se pudieron purificar en suficiente cantidad para realizar los experimentos de inmunización.

Una vez que se obtuvieron las VLPs de los frutos de jitomate, se analizó la capacidad citotóxica específica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con VLPs y cVLPs. Para ello se inmunizaron cuatro grupos de ratones de la cepa C57BL/6 (H-2b) con: VLPs, cVLPs, vacuna Gardasil® y péptido antigénico RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de HPV-16. Después se evaluó el efecto citotóxico de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> sobre células TC-1 (co-transfectadas con los genes E6, E7 de HPV-16), así como células TC-1/L1 (expresando transitoriamente el gen de L1 de HPV-16). De acuerdo a los resultados obtenidos, solamente los linfocitos T CD8<sup>+</sup> provenientes de ratones inmunizados con cVLPs lisaron a las células tumorales TC-1, mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> derivados de los ratones inmunizados con VLPs no presentaron esta actividad.

Sin embargo, cuando se utilizó TC-1/L1 como células blanco, tanto los linfocitos T CD8<sup>+</sup> derivados de ratones inmunizados con cVLPs así como con las VLPs fueron capaces de lisar a las células TC-1/L1; igualmente cuando los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones inmunizados con la vacuna comercial Gardasil así como con el péptido antigénico RAHYNIVTF derivado de la proteína E7 de HPV-16 (el cual está incluido en el péptido de epítopes E6 y E7 de la cVLP), también fueron capaces de lisar a las células TC-1/L1 y TC-1 respectivamente. Estos resultados se explican porque las VLPs no presentan los epítopes E6 y E7, por tanto los linfocitos T citotóxicos provenientes de ratones inmunizados con estas VLPs no fueron capaces de reconocer a los antígenos que presentan las células tumorales TC-1, que como ya se mencionó están co-transfectadas con los genes E6, E7 de HPV-16. Caso contrario cuando las células TC-1 fueron transfectadas además con L1 (TC-1/L1), los linfocitos T citotóxicos de ratones inmunizados con VLPs reconocieron a las células TC-1/L1. Con base a estos resultados se sugiere que la inmunización con ambos tipos de VLPs producidos en plantas de jitomate, induce la generación de linfocitos T citotóxicos específicos para epítopes de las proteínas virales L1 y para el inserto E6/E7 incluido en la cVLP.

Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos con cVLPs preparadas en baculovirus conteniendo a la L1 fusionada a los primeros 60 aminoácidos de E7 con las cuales se indujeron anticuerpos contra L1 y una respuesta citotóxica en ratones inmunizados con DNA (Kuck *et al* 2006). Igualmente, cVLPs preparados en *E. coli*, en donde insertaron 60 aminoácidos de E7 de HPV-16 en el carboxilo terminal de L1, las partículas quiméricas resultantes indujeron anticuerpos contra L1 y una respuesta citotóxica significativa contra E7 en ratones (Schafer *et al* 1999). Se ha reportado que los epítopes de E6 y E7 utilizados en nuestro trabajo pueden causar regresión de la enfermedad y eliminación de la infección viral (Ressing *et al* 1995; Kadish *et al* 2002; Khammanivong *et al* 2003).

Después de que se demostró que *in vitro* los linfocitos T derivados del bazo de ratones inmunizados con VLPs obtenidos de jitomate fueron capaces de lisar a las células tumorales TC-1, se procedió a inocular células tumorales TC-1 en ratones y después de generar un tumor se aplicó VLPs y cVLPs cada 15 días con la finalidad de evaluar su

efecto sobre el crecimiento tumoral. La inmunización con VLPs después de la inoculación con células tumorales dio como resultado una disminución del tamaño tumoral cercano al 20% mientras que el grupo que fue tratado con cVLPs presentó una disminución del 50%. Estos resultados sugieren el potencial terapéutico que tienen las cVLPs derivadas de plantas de jitomate, y son consistentes con lo reportado en otros trabajos en los que se muestra tanto a E6 al igual que a E7 como importantes componentes de vacunas terapéuticas debido a su capacidad de inducir una respuesta antitumoral (Massa *et al* 2007).

El motivo de que no haya una eliminación del tumor del 100% se puede deber a diferentes razones; entre la que se encuentra el reclutamiento de células T reguladoras en el ambiente tumoral; estas células son potentes inhibidores de la respuesta inmunológica antitumoral, ya que poseen características inmunosupresoras y también la secreción de factores inmunosupresores como IL-10 y TGF  $\beta$  (von Boehmer 2005, Visser *et al* 2007). Por otro lado, cuando se establece un tumor comienzan a darse una serie de sucesos que en conjunto llevan a la tolerancia del individuo hacia el tumor, es por esto que las posibilidades de eliminar una masa tumoral bien establecida por acción del sistema inmune se ve limitado (Rabinovich *et al* 2007; Abbas *et al* 2007).

En modelos de ratón se ha establecido que la presencia de linfocitos T citotóxicos específicos para E6 y E7 de HPV-16 generan una fuerte respuesta que da como resultado la protección contra retos tumorales, tal es el caso del trabajo en donde se produjeron capsómeros en *E. coli* de HPV-16 con los primeros 60 aminoácidos de E7. Estos capsómeros fueron capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra VLPs y activar una respuesta citotóxica contra L1 y E7 (Bian *et al* 2008). En otro reporte probaron una vacuna contra HPV-16 obtenida de *Nicotiana benthamiana*, la cual se basó en la proteína E7 no transformante fusionada con  $\beta$ -1,3-1,4-glucanasa de *Clostridium thermocellum*. Dos dosis fueron administradas en intervalos de dos semanas a grupos de ratones C57BL/6 de tres a seis días después del reto tumoral con células TC-1 y los resultados demostraron la inhibición del crecimiento tumoral y el

incremento de la sobrevivencia. Estos datos sugieren el potencial que tienen las plantas como plataformas para producir vacunas terapéuticas (Venutti *et al* 2009).

Las cVLPs utilizadas en este trabajo que provienen de plantas de jitomate, presentan epítopes altamente inmunogénicos no solo de la proteína oncogénica E7 sino también de E6, lo cual es la primera vez que se incluye en una VLP derivada de plantas. Además estas cVLPs incluyen epítopes antigénicos que reconocen linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes mexicanas con CaCu reportadas por nuestro grupo de trabajo (Monroy *et al* 2007).

Nuestras partículas cVLP representan blancos apropiados para vacunas terapéuticas ya que mostraron ser capaces de evocar una respuesta inmune celular específica contra las células tumorales; asimismo en otro estudio realizado por nuestro grupo de trabajo se ha demostrado la capacidad de estas partículas de producir una importante respuesta inmune humoral así como anticuerpos neutralizantes (Tapia, 2010). Ambos resultados demuestran por primera vez que partículas cVLPs derivadas de plantas tienen la propiedad de ser profilácticas y terapéuticas lo cual las hace candidatas ideales para una vacuna contra HPV.

Hoy en día existen dos vacunas en el mercado que previenen la infección por HPV, sin embargo; las infecciones a causa de este virus continúan siendo uno de los mayores problemas de salud en los países en vías de desarrollo y, a nivel mundial el CaCu se mantiene como la segunda causa de muerte por neoplasia. El alto costo de las vacunas comercializadas impide la realización de esquemas de vacunación para la población en países en donde la mayoría de las personas no tienen la posibilidad de acceder a dicho tratamiento ya que no cuentan con suficientes recursos económicos. Una estrategia sustentable para producir vacunas eficientes en los últimos años ha sido la expresión de inmunógenos recombinantes en plantas con el fin de obtener partículas que sirvan para la realización de planes de vacunación basados en esquemas terapéuticos (Ludwing *et al* 2007).

## **CONCLUSIONES**

La cromatografía de inmunoafinidad fue un método apropiado y efectivo para la purificación de VLPs y cVLPs producidas en las plantas de jitomate.

Las VLPs y cVLPs producidas en jitomate fueron capaces de estimular una respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos.

La inmunización con cVLPs después de la inoculación con las células tumorales indujo una disminución del tamaño tumoral del 50%.

Las cVLPs analizadas en el presente trabajo representan una prometedora estrategia terapéutica contra células tumorales que expresen antígenos de HPV-16.

## PERSPECTIVAS

La idea de utilizar vacunas quiméricas a base de VLPs, es la de inducir una respuesta inmune humoral y celular que permitan proteger al individuo de infecciones persistentes producidas por el virus, además de eliminar a las células infectadas o transformadas. De manera paralela, se ha estudiado la capacidad de las cVLPs generadas en las plantas de jitomate, para inducir anticuerpos neutralizantes. En el presente trabajo se demostró que las cVLPs tienen una importante capacidad inmunogénica para inducir una respuesta efectora contra células tumorales conteniendo los antígenos E6 y E7 de HPV-16, los cuales están presentes en más del 50% de los tumores de CaCu. Esto abre un nuevo potencial en su uso para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, es necesario estudiar varios aspectos que podrían repercutir en una mejor respuesta inmune con la aplicación de estas partículas como son:

- Analizar el papel de las células dendríticas activadas con estas partículas en este modelo de estudio.
- Evaluar la capacidad de protección inducido por las cVLPs previa al reto tumoral.
- Evaluar la capacidad inmunogénica de estas partículas *per se* y utilizando diversos adyuvantes.
- Analizar la inmunogenicidad de las cVLPs a través de varias vías de inmunización.
- Analizar los tiempos de sobrevivencia durante la aplicación de estas partículas en los casos arriba mencionados.

## BIBLIOGRAFIA

Abbas. A. L., Lichtman A. L., Pillai. S. (2007). Cellular and Molecular Immunology. 6<sup>th</sup> Saund. Elsev; Philadelphia, USA, 537 pp.

Bosch F. X., Lorincz A., Muñoz N., Meijer C. J., Shah K. V. (2002). The Causal Relation between Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *J Clin Pathol*; 55: 244–65.

Beutner K., (1997). Human Papillomavirus and Human Disease. *Am J Med*; 102: 9-15.

Brady C. S., Duggan-Keen M. F., Davidson J. A., Varley J. M., Ster P. L. (1999). Human papillomavirus Type 16 E6 Variants in Cervical Carcinoma: Relationship to Host Genetic Factor and Clinical Parameters. *J. Gen. Virol.*; 80: 3233-3240.

Biemelt S., Sonnewald U., Galmbacher P., Willmitzer L., Müller M. (2003). Production of Human Papillomavirus Type 16 Virus-like Particles in Transgenic Plants. *J. of Virol.* 77: 9211-9220.

Boshart M., Zur Hausen H., (1986). Human Papillomaviruses (HPV) in Buschke–Loewenstein Tumors: Physical State and Identification of a Tandem Duplication in the Non-coding Region of a HPV 6-Subtype. *J. Virol.* 58: 963–966.

Canaday D. H., Wilkinson R. J., Li Q., Harding C. V., Silver R. F., Boom W. H. (2001). CD4<sup>+</sup> AND CD8<sup>+</sup> Cells Kill Intracellular Mycobacterium tuberculosis by a Perforin and Fas/Fas Ligand-Independent Mechanism. *J Immunol*, 167: 2734-2742.

Castellanos M. R., Hayes R. L., Maiman M. A. (2001). Synthetic Peptides Induce a Cytotoxic Response Against Human Papillomavirus Type 18. *Gyn Oncol*, 82: 77-83.

Castellsage X, Muñoz N. (2003). Chapter 3: Cofactors in Human Papillomavirus Carcinogenesis. Role of Parity, Oral Contraceptives and Tobacco Smoking. *J Natl Can. Inst Monogr*; 20-8.

Chong T., Apt, D., Gloss B., Isa M., Bernard H. U. (1991). The Enhancer of Human Papillomavirus type 16: Binding Sites for the Ubiquitous Transcription Factors Oct-1,

NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 Participate in Epithelial Cell-Specific Transcription. *J Virol*; 65: 5933-5943.

Cid A. Arregui. (2009). Therapeutic Vaccines against Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Open Virol. J*; 3: 67-83.

Clifford G. M., Smith J. S., Plummer M., Munoz N., Franceschi S. (2003). Human Papillomavirus Types in Invasive Cervical Cancer Worldwide: a Meta-Analysis. *Br J Can*; 88(1): 63-73.

Coggin J. R., Zur Hausen H. (1979). Workshop on Papillomaviruses and Cancer. *Can. Res*; 39: 545-552.

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, *J. of Virol*; 76: 2739–2752.

De Villiers E. M., Gissmann, L., and Zur Hausen, H. (1981) *J. Virol*; 40: 932-935.

De Villiers E. M., Fauquet C., Broker T. R., Bernard H. U., Zur Hausen H. (2004). Classification of Papillomaviruses. *Virology*; 324: 17-27.

Dias D., Van Doren J., Schlottmann S., Kelly S., Puchalski D., Ruiz W., Boerckel P., Kessler J., Antonello J. M., Green T., Brown M., Smith J., Chirmule N., Barr E., Jansen K. U., Esser M. T. (2005). Optimization and Validation of a Multiplexed Luminex Assay to Quantify Antibodies to Neutralizing Epitopes on Human Papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunol*; 12: 959-969.

Documento de Consenso de las Sociedades Científicas. Vacuna profiláctica frente al VPH. 31 enero 2007.

Dupuy C., Buzoni-Gatel D., Touze A., Le Cann P., Bout D., Coursaget P. (1997). Cell Mediated Immunity Induced in Mice by HPV 16 L1 Virus-like Particles. *Microb. Path*; 22: 219-225.

Dyson N., Howley P. M., Munger K., Harlow E. (1989). The Human Papillomavirus-16E7 Oncoprotein is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Sci*; 243: 934-937.

Dyson N. (1998). The Regulation of E2F by pRB Family Proteins. *Genes Dev*; 12: 2245-2262.

Einstein H. M. (2008). Acquired Immune Response to Oncogenic Human Papillomavirus Associated with Prophylactic Cervical Cancer Vaccines. *Cancer. Immunol*; 57:443–451.

Fausch S. C., Da Silva D. M., Rudolf M. P. (2002). Mechanism used by Human Cells: A Possible Immune Escape Particles Do Not Activate Langerhans Human Papillomavirus Virus-Like Particles. *J. of Immunol*; 169: 3242-3249.

Fazel N., Wilczynski S., Lowe L. (1999). Clinical, Histopathologic and Molecular Aspects of Cutaneous Human Papillomavirus Infections. *Dermatol Clin*; 17: 521-36.

Finzer P., Aguilar-Lemarroy A., Rosl F. (2002). The Role of Human Papillomavirus Oncomproteins E6 and E7 in apoptosis. *Can. Lett*; 188: 15-24.

Franconi R., Di Bonito P., Dibello F., Accardi L., Muller A., Cirilli A., Simeone P., Donà M.G., Venuti A., and Giorgi C. (2002). Plant-derived Human Papillomavirus 16 E7 Oncoprotein Induces Immune Response and Specific Tumor protection, *Can. Res*; 62: 3654-3658.

Frazer I. H. (1996). Immunology of Papillomavirus Infection. *Curr Opin. Immunol*; 8(4):484-91.

Frazer I.H., Quinn M., Nicklin J. M., Tan J., Perrin L. C., Ngd P., O’Connore V. M., Whitea O., Wendta N., Martina J., Crowleyf J M. (2004). Phase I Study of HPV16-Specific Immunotherapy with E6E7 Fusion Protein and ISCOMATRIX™ Adjuvant in Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Vacc*; 23: 172-181.

Frazer I.H. (2004). Prevention of Cervical Cancer Through Papillomavirus Vaccination. *Nat. Rev. Immunol*; 4: 123-128.

Frazer I. H. (2009). Therapeutic Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *The Open Virol. J*; 3:67-83.

Freyschmidt E. J., Alonso A., Hartmann G., Gissmann L. (2004). Activation of Dendritic Cells and Induction of T Cell Responses by HPV 16 L1/E7 Chimeric Virus-like Particles are Enhanced by CpG ODN or Sorbitol. *Antivir Ther*; 9: 479–489.

Gérard C. M., Baudston N., Kraemer K., Bruck C., Garçon N., Paterson Y., Pan Z. K., Pardoll D. (2001). Therapeutic Potential of Protein and Adjuvant Vaccinations on Tumor Growth. *Vacc*; 19: 2583-2589.

Gartnett T. O., Duerksen-Hughes P. J., (2006). Modulation of Apoptosis by Human Papillomavirus (HPV) Oncoproteins. *Arch. Virol*; 151: 2321-2335.

Gage J. R., Meyers C., Wettstein F. O. (1990). The E7 proteins of the Nononcogenic Human Papillomavirus Type 6b (HPV-6b) and of the Oncogenic HPV-16 Differ in Retinoblastoma Protein Binding and other Properties. *J. Virol*; 64: 723-730.

García-Sicilia J. (2006). Vacunación Frente a la Infección Genital por el Virus del Papiloma: Prevención del Cáncer de Cérvix. *An Ped Contin*; 4: 320-3.

Gissmann L. (2009). HPV Vaccines: Preclinical Development. *Med. Res*; 40: 466-470.

Gissmann, L., Pfister, H., and Zur Hausen, H. (1977). Human Papilloma Viruses (HPV): Characterization of Four Different Isolates. *Virol*; 76: 569-580.

Grgacic E. V. L., Anderson D. A. (2006). Virus-like Particles: Passport to Immune Recognition. *Meth*; 40: 60–65

Gutierrez O. A., Sandoval M. C., de Olivera F. T. J., Santos A. L., Gomez L. M. A. (2005). Expression of Functional Interleukin-12 from Mouse in Transgenic Tomato Plants, *Trans. Res*; 14:877-85.

Harper D. M., Franco E. L., Wheeler C., Ferris D. G., Jenkins D., Schuind A., Zahaf T., Innis B., Naud P., De Carvalho N. S., Roteli-Martins C. M., Teixeira J., Blatter M. M., Korn A. P., Quint W., Dubin G; GlaxoSmithKline HPV Vaccine Study Group. (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*; 364:1731-2.

Howley P. M. (2001). Role of the Human Papillomaviruses in Human Cancer. *Can. Res*; 51: 5019-5022.

Huang Z., Elkin G., Maloney B. J., Beuhner N., Arntzen C. J., Thanavala Y. M. (2005). HS: Virus-like Particle Expression and Assembly in Plants: Hepatitis B and Norwalk Viruses. *Vacc*; 23: 1851-1858.

Informe público evaluación Gardasil®. (2006). EMEA.

Informe público evaluación Cervarix®. (2007). EMEA.

Jablonska, S., and Milewski, B. (1957) *Derm*; 115: 1-22.

Janeway C. A., Travers P., Walport M. S. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Churchill Livingstone and Garland Publ; 887 pp.

Kadish A. S., Timmins P., Wang Y., Ho G. Y., Burk R. D., Ketz J., He W., Romney S. L., Johnson A., 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. *Can. Epidemiol. Biomarkers Prev*; 11: 483-488.

Kahn J, A., Rosenthal S, L., Succop P, A., Ho G, Y., Burk R, D. (2002). Mediators of the Association between Age of First Sexual Intercourse and Subsequent Human Papillomavirus Infection *Pediatrics*; 109: E5.

Kahn J. A. (2009). HPV Vaccination for the Prevention of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *N. Engl. J. Med*; 361: 271–8.

Kaufmann A. M., Nieland J. D., Jochmus I., Baur S., Friese K., Gabelsberger J., Gieseking F., Gissmann L., Glasschröder B., Grubert T., Hillemanns P., Höpfl R., Ikenberg H., Schwarz J., Karrasch M., Knoll A., Küppers V., Lechmann M., Lelle R. J., Meissner H., Müller R. T., Pawlita M., Petry K. U., Pilch H., Walek E., Schneider A. (2007). Vaccination Trial with HPV16 L1E7 Chimeric Virus-like Particles in Women Suffering from High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN 2/3) *Int. J. Can*; 121: 2794–2800.

Kenneth M. M., Travers P., Walport M. (2008). *Janeway's Immunobiology*. 7ed, Garland Sci, New York, 887 pp.

Khammanivong V., Liu X. S., Liu W. J., Rodda S. J., Leggatt G. R., Tndle R. W., Frazer I. H., Fernando G. J. (2003). Paucity of Functional CTL Epitopes in the E7 Oncoprotein of Cervical Cancer Associated Human Papillomavirus type 16. *Immunol Cell Biol*; 81: 1-7.

Kindt T. J., Goldsby R. A., Osborne B. A. (2007). *Inmunología de Kuby*. 6ª ed. Editorial McGrawHill. México. 574 pp.

Kirnbauer R., Taub J., Greenstone H., Roden R., Durst M., Gissmann L., Lowy D., and Schiller J. T. (1993). Efficient Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 16 LI and L1-L2 into Virus-Like Particles, *J. of Virol*; 67: 6929-6936.

Kurman R. J., Schiffman M. H., Lancaster W. D. (1998). Analysis of Individual Human Papillomavirus Types in Cervical Neoplasia. A Possible Role for Type 18 in Rapid Progression. *Am. J. Obstet. Gynecol*; 159: 293-296.

Lancey C. J. N., Lowndes C. M., Shah K. V. (2006). Magnitud y tratamiento de las patologías no cancerosas asociadas al VPH: patologías asociadas a los VPH 6 y 11. *Vacc*; 24: 35-42.

Lewandowsky F., Lutz, W. (1922) *Arch. Dermatol. Syph. Berlin*; 141: 193-203.

Lin K. Y., Guarnieri F. G., Staveley-O'Carroll K. F., Levitsky H. I., August J. T., Pardoll D. M., Wu. (1996). TC: Treatment of Established Tumors with a Novel Vaccine that Enhances Major Histocompatibility Class II Presentation of Tumor Antigen. *Can. Res*, 56: 21-26.

Lin K. Y., Doolan K., Fu-Hung Ch., Wu T.C. (2010). Perspectives for Preventive and Therapeutic HPV Vaccines. *J Formos Med. Assoc*; 109: 4–24.

Ludwing C., Wagner R. (2007). *Virus-like Particles –universal Molecular Toolboxes*. Elsev; 28: 537-545.

Mao C. (2006). Efficacy of Human Papillomavirus-16 Vaccine to Prevent Cervical Intraepithelial Neoplasia: a Randomized Controlled Trial. *Obstet. Gynecol*; 107: 18-27.

Martinón T. F., Bernaola I. E., Giménez S. F., Baca C. M., de Juan M. F., Díez J., Garcés S. M., Gómez C. J. A., Picazo J.J., Pineda S. V. (2006). Vacuna frente al virus del papiloma humano: un nuevo reto para el pediatra. *An. Ped. Barcelona*; 65: 461-69.

Mason H. S., Ball J. M., Shi J. J., Jiang X., Estes M. K., Arntzen C. J. (1996). Expression of Norwalk Virus Capsid Protein in Transgenic Tobacco and Potato and its Oral Immunogenicity in Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 93: 5335-40.

Mason H. S., Warzecha H., Mor T., Arntzen C. J. (2002). Edible Plant Vaccines: Applications for Prophylactic and Therapeutic Molecular Medicine. *Trends Mol Med*; 8: 324-9.

Massa S., Franconi R., Brandi R., Muller A., Mett V., Yusibov V., Venuti A. (2007). Anti-cancer Activity of Plant- Produced HPV16 E7 Vacc; 25: 3018-3021.

Monroy A., Hernández J., Mora M., (2007). Identification of Epitopes from L1 E6 and E7 Proteins of HPV-16 and -18 Types and Implications for Diagnosis and Treatment of Cervical Carcinoma. In: *Advances in Cancer Research at UNAM*. Mas-Oliva J. (editor) and Ninomiya A. J., García A., Carrancá (co-editores). Man. Mod;. pp. 1-32 ISBN 970-32-428-9.

Muller M., Zhou J., Reed T. D., Rittmuller C., Burger A., Gabelsberger J., Braspenning J., Gissmann L. (1997) Chimeric Papillomavirus-like Particles. *Virology*; 234: 93-111

Munger K., Werness B. A., Dyson N., Phelps W. C., Harlow W., Howley P. M. (1989). Complex Formation of Human PapillomavirusE7 Proteins with the Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene Product. *Embo. J*; 8: 4099-4105.

Muñoz N., Bosch F. X., Castellsague X., Diaz M., de SS, Hammouda D. (2004). Against which Human Papillomavirus Types Shall We Vaccinate and screen? The International Perspective. *Int. J Can*; 111: 278-85.

Muñoz N., Castellsagué X., Berrugton de Glez A., Gissmann L. (2006). El Virus del Papiloma Humano en la Etiología del Cáncer Humano. *Vacc*; 53: 1-10.

Nevins J. R. (1992). E2F: a Link between the Rb Tumor Suppressor Protein and Viral Oncoproteins. *Sci*; 258: 424-429.

Newall A. T., Beutels P., Wood J. G., Edmunds W. J., MacIntyre C. R. (2007). Cost-Effectiveness Analyses of Human Papillomavirus Vaccination. *Lancet Infect Dis*; 7:289–96.

Orth, G., Favre, M., and Croissant, O. (1977) *J. Virol*; 24: 108-120.

Orth, G., Jablonska, S., Favre, M., Jarzabek-Chorzelska, M., Rzeska, G. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 75: 1537-1541.

Park M.A., Kim H. J., Kim H. J. (2008). Optimum Conditions for Production and purification of Human Papillomavirus Type 16 L1 Protein from *Saccharomyces cerevisiae*, *Protein Expr. Purif*; 59: 175–181.

Parkin D, M., Bray F. (2006). Chapter 2: The Burden of HPV-related Cancers. *Vaccine*; 24 Suppl 3: S11–25.

Passmore S., Burch V. C., Shephard E. G., Marais D. J., Allan B., Kay P., Rose R. C., Williamson A. L. (2002). Single-cell Cytokine Analysis Allows Detection of Cervical T-Cell Responses Against Human Papillomavirus Type 16 L1 in women Infected With Genital HPV. *J Med. Virol*; 67: 234-240.

Paz de la Rosa G, Gómez L. M. A. (2006). Expresión of a chimeric HPV-16 VLP in transgenic plants 23rd Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. Praga, República Checa.

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*) en Animales de Laboratorio. Tesis de Doctorado. CINVESTAV Irapuato.

Phelps W. C., Yee C. L., Munger K., Howley P. M. (1988). The Human Papillomavirus Type 16E7 Gene Encodes Transactivation and Transformation Functions Similar to those of Adenovirus E1A. *Cell*; 53: 539-547.

Picconi M. A., Gronda J., Alonio L. V., Fichero L., Miranda S., Barcena M., Teysse A. (2002). Virus del Papiloma Humano en Mujeres Quechuas Jujeñas con Alta Frecuencia de Cáncer de Cuello Úterino, Tipos Virales y Variantes de HPV-16. *Med. Argentina*; 3: 209-220.

Plummer M., Herrero R., Franceschi S., Meijer C, J., Snijders P, Bosch F, X., *et al.* (2003). IARC Multi-centre Cervical Cancer Study Group Smoking and Cervical Cancer: Pooled Analysis of the IARC Multicentric Case- Control Study. *Cancer Cause Contr*; 14: 805-814.

Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*; 25: 267-296.

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; *177(5)*: 469-79.

Regueiro J. R., López C., González S., Martínez E. (2002). *Inmunología Biología y Patología del Sistema Inmune*. Editorial Médica Panamericana. 3ª edición. España. 202 pp.

Ressing M. E., Sette A., Brandt R. M., Ruppert J., Wentworth P. A., Hartman M., Oseroff C., Grey H. M., Melief C. J. (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. *J Immunol*; 154: 5934-5943.

Roitt I. M., Brostoff J., Male D. (2003). *Inmunología*. Ed. Panamericana Madrid. pp. 429.

Santi L., Huang Z., Mason H. (2006). Virus Like-particles Production in Green Plants. *Meth*; 40: 66-76.

Schafer K., Muller M., Faath S., Henn A., Osen W., Zentgraf H., Benner A., Gissmann L., Jochmus I. (1999). Immune Response to Human Papillomavirus 16 L1E7 Chimeric

Viruslike Particles: Induction of Cytotoxic T Cells and Specific Tumor Protection. *Int J Can*; 81: 881–888.

Scheffner M., Huibregtse J. M., Levine A. J., Howley P. M. (1990). The E6 Oncoprotein Encoded by a Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of p53. *Cell*; 63: 1129-1136.

Stanley M., Gissmann L., Nardelli-Haeffliger D. (2008). Immunobiology of Human Papillomavirus Infection and Vaccination-Implications for Second Generation Vaccines. *Vacc*; 26: 62-67.

Sterlinko H. G. (2009). Human Papillomavirus Infection, Cancer and Therapy. *Indian J. Res*; 130: 277-285.

Stubenrauch F., Laiminis L. A. (1999). Co-transformation by Human Papillomavirus Type 6 and 11. *J. Gen. Virol*; 71: 165-171.

Tapia G. Y. (2010). Partículas Semejantes al Virus del Papiloma Humano Tipo 16 Obtenidas en Plantas de Transgénicas de Jitomate Generan Anticuerpos Específicos en Ratones Inmuneizados. Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.

Thomas J. T., Hubert W. G., Ruesch M. N., Laimins L. A. (1999). Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are Required for the Maintenance of Episomes During the Viral Life Cycle in normal human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 96: 8449-8454.

Trottier M., Franco E, L. (2006). The Epidemiology of General Human Papillomavirus Infection. *Vacc*; 24 Suppl 1: 1-15.

Urbano L., Alvarez R. E., Acosta C. P. (2007). Virus del Papiloma Humano: Infección y Enfermedad. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Venuti A., Massa S., Mett V., Dalla L. V., Paolini F., Franconi R., Vidadí Y. (2009). An E7 based Therapeutic Vaccine Protects Mice against HPV16 based Vaccine. *Vaccine*, doi: 10.1016 J.Vacc; 01.088.

Vidart A, J, A., Cristóbal G, I., Coronado M, P., Ramírez M, M. (2007). Infección por el Virus del Papiloma Humano. Estado Actual de la Cuestión. *Folia Clin Obstet Ginecol*; 62: 6-22.

Villa L. L., Costa R. L., Petta C. A., Andrade R. P., Ault K. A., Giuliano A. R., Wheeler C. M., Koutsky L. A., Malm C., Lehtinen M., Skjeldestad F. E., Olsson S. E., Steinwall M., Brown D. R., Kurman R. J., Ronnett B. M., Stoler M. H., Ferenczy A., Harper D. M., Tamms G. M., Yu J., Lupinacci L., Railkar R., Taddeo F. J., Jansen K. U., Esser M. T., Sings H. L., Saah A. J., Barr E. (2004). Prophylactic Quadrivalent Human Papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 Virus-like Particle Vaccine in Young Women: a Randomised Double-blind Placebo-Controlled Multicentre Phase II Efficacy Trial. *Lancet Oncol*; 6(5): 256-7.

Visser J., Nijman H. W., Hoogenboom B. N., Jager P., van Baarle D., Schuurin E., Abdulahad W., Miedema F., van der Zee A. G., Daemen T. (2007). Frequencies and Role of Regulatory T Cells in Patients with (pre)malignant Cervical Neoplasia. *Clin. Exp. Immunol*; 150: 199-209.

von Boehmer H. (2005). Mechanisms of Suppression by Suppressor T cells. *Nat. Immunol*; 6: 338-344.

Werness B. A., Levine A. J., Howley P. M. (1990). Association of Human Papillomavirus Types 16 and 18 E6 Proteins with p53. *Sci*; 248: 76-79.

Wilson V. G., and Rosas-Acosta G. (2003). Molecular Targets for Papillomavirus Therapy, *Current Drug Targets – Infectious Disorders*; 3: 97-113

Winer R. L., Hugles J. P., O'Reilly S., Kiviat N. B., Holmes K. K. (2006). Condom Use and the Risk of Genital Human Papillomavirus Infections in Young Women. *N. Eng. J. Med*; 354: 2645-2654.

Xu Y. F., Zhang Y. Q., Xu X. M., Song G. X. (2006). Papillomavirus Virus-like particles as Vehicles for the Delivery of Epitopes or Genes, *Arch. Virol*; 151: 2133–2148

Zur Hausen., Meinhof, W., Scheiber, W., and Bornkamm, G. W. (1974) *Int. J. Can*; 13: 650-656.

Zur Hausen (1977) *Curr. Top. Microbiol. Immunol*; 78: 1-30.

Zur Hausen (2000). *Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion from Host-cell Control in Early Events in Carcinogenesis*. *J. Nat. Can. Inst*; 92: 690-698.

Zur Hausen. (2002). *Papillomaviruses and Cancer: from Basic Studies to Clinical Application*. *Nat Publishing Group*; 2: 342-350.

Zur Hausen. (2006). *Infections Causing Human Cancer*, Wiley-VCH, Weinheim-New York, pp. 1-517.

Zur Hausen (2009). *The Search for Infectious Causes of Human Cancers:Where and Why (Nobel Lecture)*. *Angew. Chem. Int*; 48: 5798 – 5808.

#### REFERENCIAS DE LA RED

<http://www.medwave.cl/ciencia/15.act>

#### ABREVIATURAS

DNA    Ácido Desoxiribonúcleico

HLA    Antígeno Leucocitario Humano

CaCu   Cáncer Cervicouterino

Th      Células T Cooperadoras

CINVESTAV Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

MHC    Complejo Mayor de Histocompatibilidad

EMEA   European Medicines Agency

IFN- $\gamma$    Interferón gamma

IFN- $\beta$    Interferón beta

IL      Interleucina

CTL    Linfocitos T Citotóxicos

NIC    Neoplasia Intraepitelial Cervical

VLP    Partícula Tipo Viral

L      Proteína Tardía

PTS    Proteína Total Soluble

E      Proteína Temprana

H-2    Región de Histocompatibilidad dos

LCR    Región larga de control

HPV    Virus del Papiloma Humano